

Synthese und NMR-spektroskopische Charakterisierung von Liganden für die
CD4-induzierten Epitope im Hüllprotein gp120 von HIV-1

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Volker Ralf Klaukien
aus Northeim

1. Referentin: Professor Dr. Monika Mazik
2. Referent: Professor Dr. Christian Griesinger
eingereicht am: 23.05.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.08.2007
Druckjahr: 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Tagungsbeiträge

- | | |
|------------------|--|
| 07-09/05/2003 | X. Dervillez, C. Königs, V. Wegner, V. Klaukien, C. Griesinger, U. Dietrich, <i>Identification of CD4-induced epitopes in the external glycoprotein gp120 of HIV-1 and of ligands for these Epitopes by the phage display technology</i> , 3 rd International Symposium on „Conformational Control of Biomolecular Functions“, Sportschloss Velen, Germany, (Poster). |
| 27/02-02/03/2005 | V. Klaukien, K. Overkamp, X. Dervillez, U. Dietrich, C. Griesinger, <i>Synthesis and NMR studies of peptide ligands for the CD4-induced epitopes in the external glycoprotein gp120 of HIV-1</i> , 7 th German Peptide Symposium, Braunschweig, (Poster). |
| 06-08/10/2005 | X. Dervillez, V. Klaukien, C. Königs, V. Wegner, C. Griesinger, U. Dietrich, <i>Characterization of HIV-1 entry domains and their peptide ligands</i> , 4 th International Symposium of the Volkswagen Foundation on Interplay between Molecular Conformations and Biological Function, Heidelberg, (Poster). |
| 20-25/08/2006 | V. Klaukien, X. Dervillez, U. Dietrich, C. Griesinger, <i>Synthesis and NMR studies of peptide ligands for the CD4-induced epitopes in the external glycoprotein gp120 of HIV-1</i> , XXII nd International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Göttingen, (Poster) |

Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Griesinger für das anspruchsvolle, interdisziplinäre Thema aus dem Bereich organischer Chemie, physikalischer Chemie und Biologie danken. Desweiteren danke ich Frau Prof. Dr. Monika Mazik für die Betreuung der Doktorarbeit seitens der TU Braunschweig und Herrn Prof. Dr. Peter J. Walla für das Mitwirken in der Promotionskommission.

Weiterhin bedanke ich mich bei P.D. Dr. Teresa Carlomagno für die Hilfe beim Ansetzen der kreuz-korrelierten Relaxationsmessungen, die sehr gute Einführung in die Theorie der kreuz-korrelierten Relaxation und vor allem für die freundliche Aufnahme in ihre Untergruppe.

Allen Mitarbeitern der Untergruppe von P.D. Dr. Teresa Carlomagno möchte ich mich für die fruchtbaren Diskussionen und Unterstützung bedanken.

Zahlreiche Personen waren mir eine sehr große Hilfe im Bereich der NMR-Spektroskopie: Dr. Victor Sanchez, Dr. Christoph Fares, Min-Kyu Cho, Dr. Karel Kubicek, Dr. Laurent Verdier.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern in den Chemielaboren, darunter besonders Edith Woeltjen, Fabian Peters und Dr. Mate Erdelyi, für die freundliche und produktive Arbeitsatmosphäre bedanken. Im speziellen danke ich Dr. Andrei Leonov für die äußerst kompetente Anleitung im Bereich der organischen Synthese. Dr. Peyman Sakhai danke ich für die erste Einarbeitung in die Abteilung und die Vermittlung der ersten Schritte in die Messungen am NMR-Spektrometer. Mein weiterer Dank gilt Kerstin Overkamp und Gerhard Wolf für die Anfertigung zahlreicher HPLC-Trennungen und Massenspektren. Joachim Morick danke ich für seine Unterstützung während seines Hiwi-Jobs in unserer Abteilung. Herrn Dr. Jochen Junker danke ich für die vielen Diskussionen und seine Hilfe.

Bei Fernando Rodriguez-Castaneda bedanke ich mich für die Hilfe bei der Anfertigung der Gel-Elektrophorese und Hilfe bei biologischen Fragestellungen. Desweiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Ursula Dietrich, Dr. Xavier Dervillez und Alexandra Hütner vom Georg-Speyer Haus, da gerade für diese anspruchsvollen interdisziplinären Projekte eine gute Zusammenarbeit mit Biologen unerlässlich ist.

Der Volkswagenstiftung danke ich für die Finanzierung dieses Projektes. Zum Schluß möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung in all den Jahren des Studiums bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	HI-Virus	11
1.2	HIV-Eintritt	11
1.2.1	Strukturelle Aspekte des HIV-Eintritts	14
1.2.2	Entwicklung neuer Entry-Inhibitoren	18
1.3	Zielsetzung	20
2	Peptidsynthese	21
2.1	Schutzgruppenstrategien	22
2.2	Kupplungsreagenzien	24
2.3	Nebenreaktionen	26
2.4	Sulfatierte Peptide	26
3	NMR von Protein/Ligand-Komplexen	31
4	Ergebnisse	39
4.1	Peptidsynthesen	39
4.2	Synthese Tyrosin <i>O</i> -sulfatierter Peptide	42
4.2.1	Einbau von Tyrosin <i>O</i> -Sulfat	42
4.2.2	Sulfatierung des geschützten Peptides	42

4.2.3	Synthese Tyrosin <i>O</i> -Sulfatierter Peptide für die CD4i-Epitope	43
4.2.4	Synthese CCR5-N-terminaler Peptide	44
4.2.5	Optimierung der Abspaltungsbedingungen Tyrosin- <i>O</i> -sulfatierter Peptide	45
4.2.6	Syntheseoptimierung des 3A9 und 5C7 Peptides	49
4.3	NMR-Experimente	52
4.3.1	Kontrolle der Proteine	52
4.3.2	tr-CCR Experimente	54
4.3.3	Zersetzungsproblem der sulfatierten Peptide	57
4.4	Synthese eines Tyrosin <i>O</i> -Sulfat Mimetikums	58
4.4.1	Versuchter Aufbau von Phe(CH ₂ SO ₃)-OH durch enantioselektive Alkylierung . . .	61
4.5	Synthese des ¹⁵ N Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH Derivates	63
4.6	NMR Experimente F(CH ₂ SO ₃)-OH modifizierter Peptide	64
4.6.1	tr-CCR Experimente	68
4.6.2	STD NMR Experimente	72
4.7	HIV Entry Assay	73
4.8	Synthese eines CD4 Miniproteins	74
5	Schutzgruppenentwicklung Asn/Gln	77
6	Zusammenfassung und Ausblick	87
7	Experimenteller Teil	89
7.1	Material und Methoden	89
7.1.1	Chemikalien	89
7.1.2	HPLC-Messungen	89

7.1.3	Massenspektren	90
7.1.4	NMR-Spektroskopie an Ligand/Protein Komplexen	90
7.1.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	90
7.1.6	Probenvorbereitung	91
7.1.7	NMR-Spektroskopie	91
7.1.8	IR-Spektroskopie	92
7.1.9	Allgemeine Arbeitsvorschrift Fmoc-Schützung	92
7.2	Festphasensynthese	93
7.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift 433A Peptide Synthesizer	93
7.2.2	Allgemeine Arbeitsvorschrift manuelle Peptidsynthese	93
7.2.3	Abspaltungsreaktionen	94
7.2.4	Abspaltung Tyrosin <i>O</i> -sulfatierter Peptide	94
7.3	Beschreibung der Versuche	95
7.4	Synthese der Peptide	105
7.4.1	Synthese von 12A1	105
7.4.2	Synthese von $[Y(SO_3)^9]$ 12A1	106
7.4.3	Synthese von 12A2 Biotin	107
7.4.4	Synthese von $[Y(SO_3)^6]$ 12A3	108
7.4.5	Synthese von XD3	109
7.4.6	Synthese von $[Y(SO_3)^8]$ XD3	110
7.4.7	Synthese von $[Y(SO_3)^6]$ XD3	111
7.4.8	Synthese von $[Y(SO_3)^6, Y(SO_3)^8]$ XD3 Sulfatierung am Harz	112

7.4.9	Synthese von $[Y(SO_3)^6, Y(SO_3)^8]$ XD3 Einbau $Y(SO_3)$	113
7.4.10	Synthese von XD3 Biotin	114
7.4.11	Synthese von $[Y(SO_3)^8]$ XD3 Biotin	115
7.4.12	Synthese von $[Y(SO_3)^6]$ XD3 Biotin	116
7.4.13	Synthese von Ac- $(^{15}N, ^{13}C)$ Gly- XD3	117
7.4.14	Synthese von $[Y(SO_3)^3, Y(SO_3)^{10}, Y(SO_3)^{14}]$ CCR5 2-18	118
7.4.15	Synthese von CCR5 2-18 ^{15}N Gly	119
7.4.16	Synthese von CCR5 2-22 Biotin	120
7.4.17	Synthese von CCR5 1-22	121
7.4.18	Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ CCR5 1-22 Biotin	122
7.4.19	Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ CCR5 1-22	123
7.4.20	Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ mar- kierten CCR5 1-22	124
7.4.21	Synthese von 3A9	125
7.4.22	Synthese von $[Y(SO_3)^5]$ 3A9	126
7.4.23	Synthese von 3A9 Biotin	127
7.4.24	Synthese von 5C7	128
7.4.25	Synthese von 5C7 Biotin	129
7.4.26	Synthese von CD4M33	130
7.5	Abkürzungsverzeichnis	132

Literatur	135
------------------	------------

A Zuordnung von CCR5 1-22	151
----------------------------------	------------

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	7
B Probenverzeichniss tr-CCR Messungen	153
C Pulsprogramme	159
D Puffer	173
Lebenslauf	174

Kapitel 1

Einleitung

Seit dem erstmaligen Auftreten des Krankheitsbildes *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) im Jahr 1981 [1, 2] und der Identifizierung der beiden Varianten des Humanen Immundefizienz-Virus HIV-1 [3, 4] im Jahr 1983 und HIV-2 [5] im Jahr 1986 hat sich die Krankheit zu einer weltweiten Epidemie entwickelt. Die Daten aus dem UNAIDS-Bericht in Abb. 1.1 und 1.2 belegen, dass HIV auch nach 20 Jahren intensiver Forschung eine immense Herausforderung darstellt. Seit den Anfängen der HIV-Therapie wurden bedeutende Fortschritte in der Bekämpfung des HI-Virus erzielt. Die Entwicklung antiretroviraler Therapiemöglichkeiten wie die *highly active antiretroviral therapy* (HAART) hat für viele Patienten die HIV-Infektion zu einer chronischen Krankheit werden lassen [6]. Auch wenn die Lebensqualität erheblich verbessert ist, gibt es eine Reihe von Einschränkungen in der antiretroviralen Therapie. So gibt es eine große Zahl von Patienten, welche die Durchführung einer retroviralen Therapie nicht vertragen [7]. Die Hauptschwierigkeiten in der Behandlung von HIV liegen darin, dass aufgrund der hohen Variabilität des Virus und seiner außergewöhnlichen Verteidigungsstrategien nur schwer Wirkstoffe gefunden werden, die eine breite Anzahl verschiedener HIV-Stämme neutralisieren. Die extrem hohe Mutationsrate des Virus trägt weiterhin dazu bei, dass das Virus schnell Resistenzen entwickelt, wodurch sich ein stetiger Bedarf an neuen Wirkstoffen ergibt. In den neunziger Jahren ist der Eintrittsprozess des HI-Virus in die Zielzelle verstärkt in den Blickpunkt der Forschung geraten.

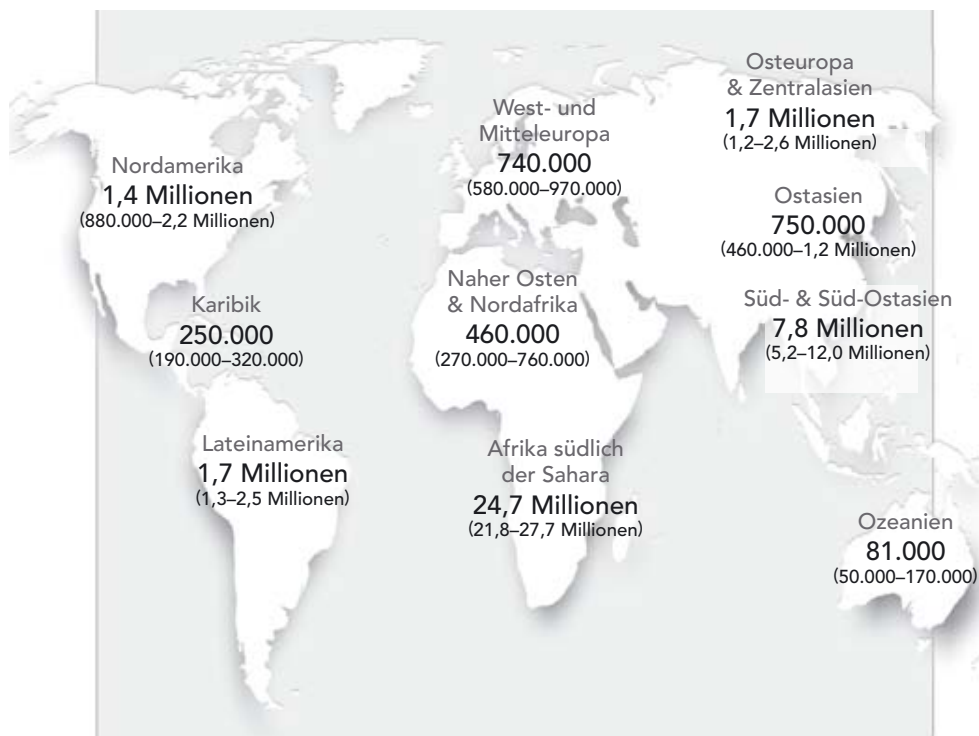


Abbildung 1.1: Regionale Verteilung HIV-Infektion, aus UNAIDS, Statusbericht 2006

Anzahl der HIV-Positiven 2006

Gesamt	39,5 Millionen (34,1–47,1 Mio.)
Erwachsene	37,2 Millionen (32,1–44,5 Mio.)
Frauen	17,7 Millionen (15,1–20,9 Mio.)
Kinder unter 15 Jahren	2,3 Millionen (1,7–3,5 Mio.)

HIV-Neuinfektionen 2006

Gesamt	4,3 Millionen (3,6–6,6 Mio.)
Erwachsene	3,8 Millionen (3,2–5,7 Mio.)
Kinder unter 15 Jahren	530.000 (410.000–660.000)

AIDS-Tote 2006

Gesamt	2,9 Millionen (2,5–3,5 Mio.)
Erwachsene	2,6 Millionen (2,2–3,0 Mio.)
Kinder unter 15 Jahren	380.000 (290.000–500.000)

Abbildung 1.2: Übersicht HIV-Epidemie, aus UNAIDS, Statusbericht 2006

1.1 HI-Virus

Das HI-Virus ist ein Retrovirus und der Familie der Lentiviren zuzuordnen. Als weitere Varianten des Virus gibt es das Simiane Immundefizienz Virus (SIV) und auch das feline Immundefizienz Virus (FIV). In Abb. 1.3 ist der Aufbau des Virus schematisch dargestellt.

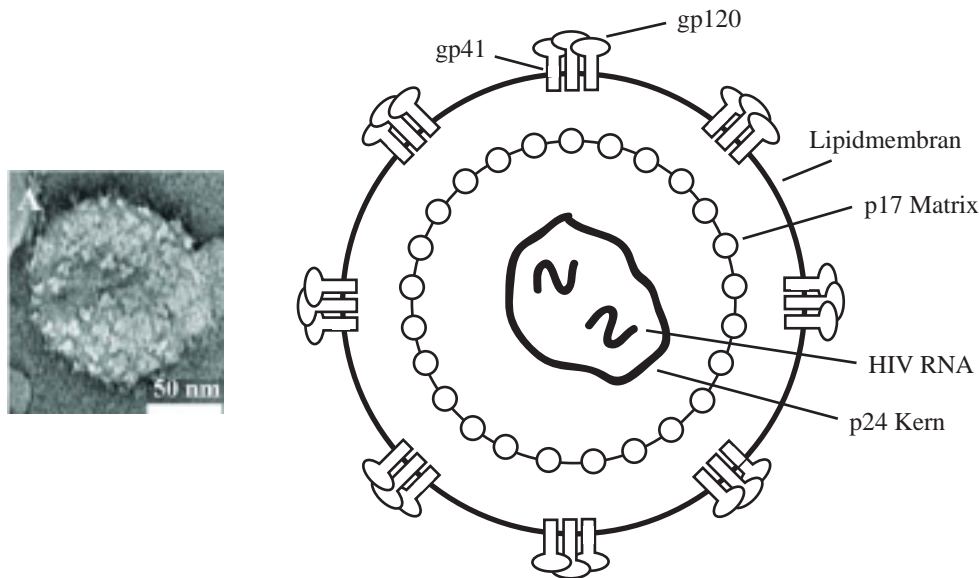


Abbildung 1.3: EM-Bild [8] und Schematischer Aufbau HIV

Das virale Hüllprotein (Env) besteht aus dem Oberflächenglycoprotein (SU) gp120, welches nichtkovalent mit dem Transmembranglycoprotein (TM) gp41 assoziiert vorliegt [9]. Beide Proteine werden aus dem gp160- Vorläuferprotein durch enzymatische Spaltung erhalten. Die funktionelle Einheit des Hüllproteins ist ein trimere Komplex aus diesem gp120/gp41-Heterodimer [10, 8], wobei sich durchschnittlich 10 Trimere auf einem Viruspartikel befinden.

1.2 HIV-Eintritt

Der Eintritt des HI-Virus ist ein komplizierter mehrstufiger Vorgang, in den verschiedene Proteine involviert sind [11]. Der Eintritt des HI-Virus in die Zelle wird zunächst durch die Bindung des externen Hüllproteins gp120 an den T-Zellrezeptor

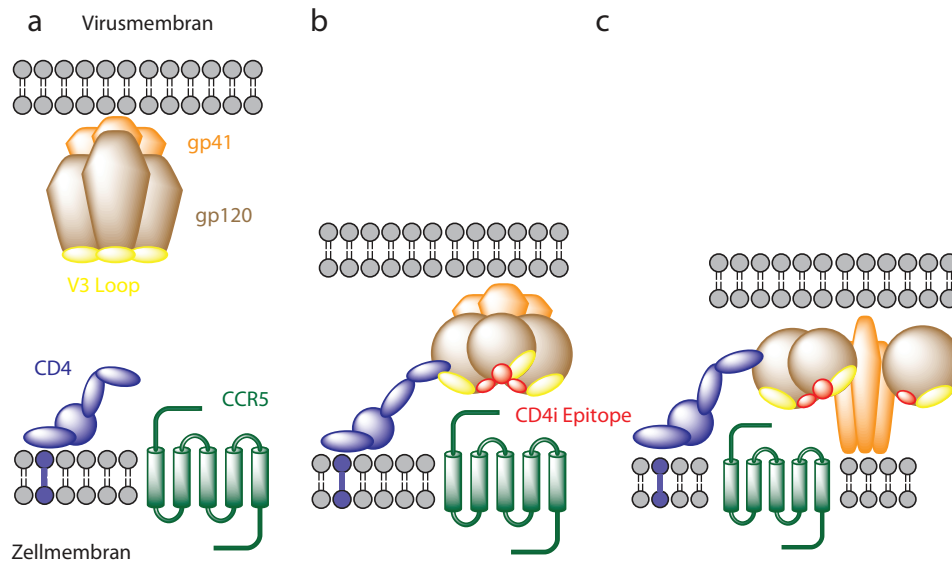


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht HIV-Eintritt

a) Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor, Konformationsänderung im gp120 führt zur Exposition der CD4-induzierten Epitope b) Bindung der CD4i-Epitope (rot) an den Korezeptor, c) Konformationsänderungen im gp41 führen zur Ausbildung eines Fusionspeptides, welches in die Zellmembran insertiert wird und die Membranfusion einleitet

CD4 eingeleitet [12, 13]. Das CD4 ist ein transmembranes Glykoprotein mit vier extrazellulären Domänen (D1-D4) und besteht aus 435 Aminosäuren [14]. Durch diese Wechselwirkung findet eine Konformationsänderung in dem gp120 statt, wodurch die Bindungsstelle für den Korezeptor freigelegt wird [15]. Es werden zwei verschiedene Korezeptoren verwendet, entweder CCR5 [16, 17, 18, 19] oder CXCR4 [20]. Beide Korezeptoren gehören zu den Chemokinrezeptoren, wobei dem CCR5-Rezeptor eine wichtige Rolle zukommt. CCR5 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) [21]. Er besteht aus 352 Aminosäuren und hat eine Masse von 40,6 kDa. Zur biologischen Funktion des Rezeptors gibt es bis jetzt wenig Erkenntnisse, er zeigt jedoch typische Eigenschaften von Chemokin-Rezeptoren. Nach der Bindung des gp120 an den Korezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung in gp41, wodurch es in die fusionsaktive Form umgewandelt wird. Die Klassifizierung des Virus erfolgt danach, welcher Korezeptor verwendet wird. Man unterscheidet hierbei die M-tropen Isolate R5 (Virus benutzt CCR5-Rezeptor), die T-tropen Isolate X4 (Virus benutzt CXCR4-Rezeptor) oder die dualtropischen Stämme R5X4, welche beide Korezeptoren verwenden können [22]. Das Auftreten der verschiedenen

Phenotypen richtet sich nach der zeitlichen Entwicklung des Virus. In den frühen Entwicklungsstadien dominiert der R5-Phenotyp, während in späterer Entwicklung hauptsächlich der X4-Phenotyp vorliegt. Analysen zeigen, dass der R5-Phenotyp bei ca. 80% der Viren vorliegt. Die zentrale Rolle des CCR5 Rezeptors für den Viruseintritt wird durch die HIV-Resistenz von Personen, die Aufgrund einer 32bp-Deletion keinen funktionellen CCR5-Rezeptor exprimieren, gezeigt [23]. Die Patienten zeigen nur eine sehr geringe Vermehrung des Virus und es kommt auch nicht zum Ausbruch von AIDS. Welcher Phenotyp vorliegt wird entscheidend durch den V3-Loop von gp120 bestimmt [24]. Durch Mutationsstudien wurde gezeigt, dass schon eine Änderung von einer Aminosäure einen Wechsel des Phenotyps von R5 nach X4 hervorrufen kann [25]. Neben dem V3-Loop gibt es aber eine konservierte Sequenz im *Bridging Sheet* (s. Abb.1.6 C) von gp120, die essentiell für die Bindung an den Korezeptor ist [24]. Bestimmte Virusvarianten benötigen nur den Korezeptor, um mit der Zelle zu fusionieren [26]. In Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Unabhängigkeit von CD4 mit einer erhöhten Neutralisationssensitivität und dem Auftreten eines stabilen CD4i-Epitopes im gp120 einhergeht. Verschiedene Punkte sind aber weiterhin noch nicht geklärt. So ist nicht bekannt, inwieweit eine Oligomerisierung des Rezeptors eine Rolle spielt. Auch sind genaue Daten über die Anzahl der beteiligten CCR5- Rezeptoren für eine Fusion schwer zu ermitteln. Die beteiligte Anzahl wurde durch entsprechende Expressionsstudien auf vier bis sechs geschätzt [27]. In den letzten Jahren haben sich auch die Hinweise gehäuft, dass es eine Assoziation zwischen CD4 und CCR5 in Abwesenheit von gp120 gibt [28]. Unklar ist auch, inwiefern die Bindung von gp120 an den Korezeptor Konformationsänderungen im Korezeptor bzw. im gp120 hervorruft. In Laborversuchen wurde demonstriert, dass eine große Anzahl unterschiedlichster Chemokinrezeptoren als Korezeptor für HIV-1 funktionieren können [29, 30]. Das deutet darauf hin, dass ein gemeinsames strukturelles Merkmal dieser Korezeptoren wichtig für die Wechselwirkung ist. In vivo werden allerdings nur die CXCR4- und CCR5- Korezeptoren genutzt.

1.2.1 Strukturelle Aspekte des HIV-Eintritts

Zur Zeit gibt es verschiedene Kristallstrukturen von gp120 im Komplex mit CD4 und verschiedenen Antikörpern [31, 32]. Das gp120 besteht aus fünf konservierten Domänen (c1-c5) und fünf variablen Domänen (V1-V5) (s. Abb.1.5). Das Protein ist extrem stark glycosiliert, ca. 50% der Masse stammen von den Zuckereinheiten. Für die

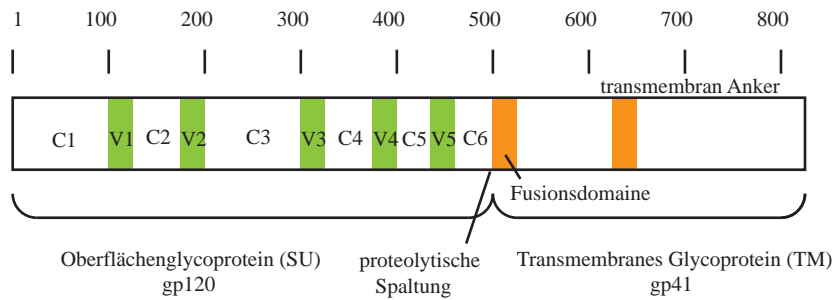


Abbildung 1.5: gp120 Domainstruktur

Kristallisation wurde das gp120 vollständig deglycosiliert, die variablen Loopregionen V1-V3 entfernt und der *C*-terminus bzw. *N*-terminus verkürzt. Desweiteren wurde auch die Struktur eines gp120 /Antikörper-Komplex mit einem CD4-Miniprotein erhalten [33]. In den letzten Jahren wurden verschiedene dieser CD4-Miniproteine entwickelt, welche ebenfalls die CD4i-Epitope induzieren [34, 35, 36, 37]. Grundlage ist ein Peptidtoxingrundgerüst, in welches essentielle Aminosäuren für die gp120-CD4-Wechselwirkung aus dem CD4 eingebaut werden. Diese Art von Miniproteinen hat sich als ein wertvolles Hilfsmittel zur Erzeugung der CD4i-Epitope erwiesen. Seit 2005 gibt es auch eine Struktur eines freien, nicht komplexierten Simianen Immundefizienz Virus (SIV) gp120 [38]. Auch hier wurden die variablen Loops entfernt, allerdings liegt der Kern noch teilweise glycosiliert vor. Aus dem Vergleich mit dem CD4 gebundenen gp120 lässt sich damit zum ersten Mal die Konformationsänderung in dem gp120 direkt verfolgen. In Abb. 1.6 sind die Unterschiede in der CD4-gebundenen gp120-HIV-1 Struktur und der freien gp120-SIV-Struktur dargestellt. In der CD4-komplexierten Form ist das *Bridging Sheet* zwischen der inneren und äußeren Domäne klar ausgeprägt (Abb. 1.6). In der freien Form sind die Korezeptorkontaktstellen sehr weit voneinander entfernt, während sie in der CD4-gebundenen Form räumlich eng beieinander liegen (Abb. 1.6 c, d und Abb. 1.7).

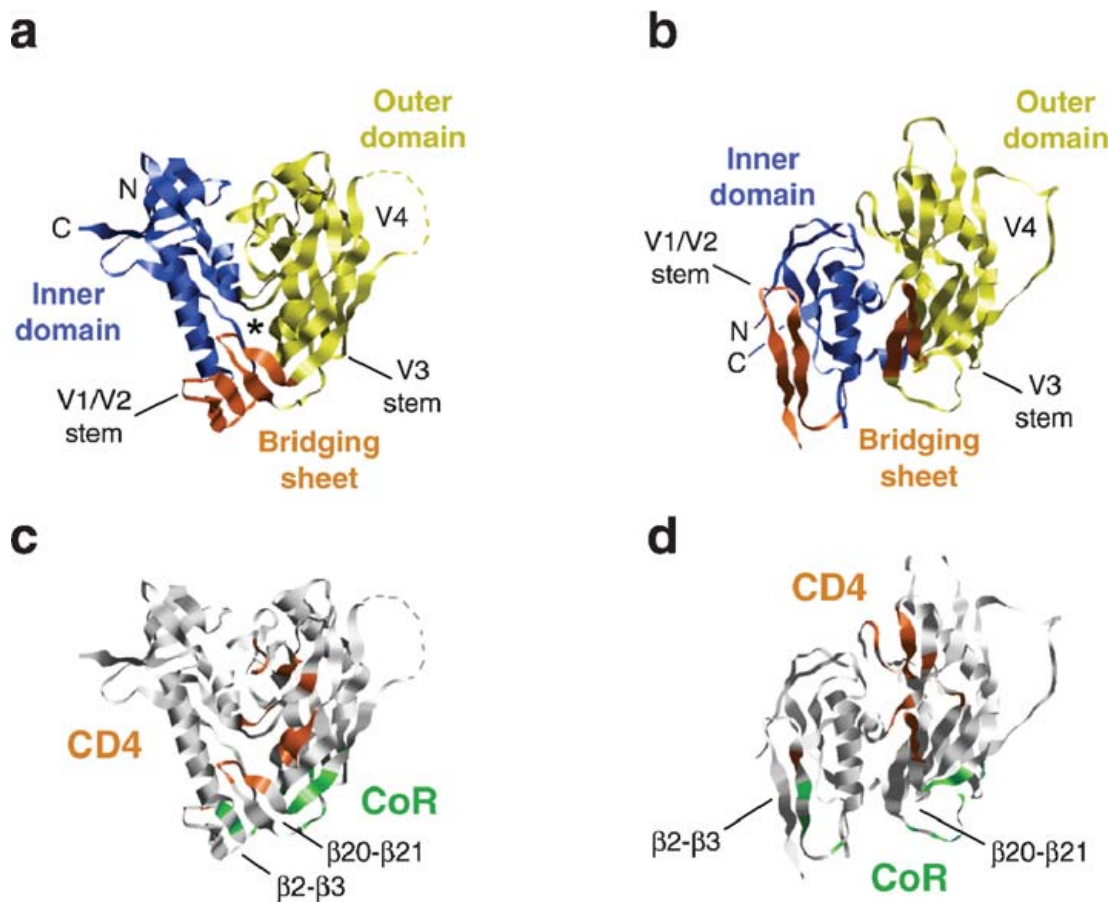


Abbildung 1.6: Vergleich der Kristallstrukturen von CD4-gebundenem HIV-1 und freiem SIV-gp120 (aus Referenz [39])

a) Struktur CD4-gebundenen HIV-1 gp120 (HXB2), **b)** Struktur freies SIV gp120 (PDB 2BF1), **c)** gleiche Struktur wie **a**, Korezeptorkontakte sind grün markiert, **d)** gleiche Struktur wie **b**, Korezeptorkontakte sind grün markiert

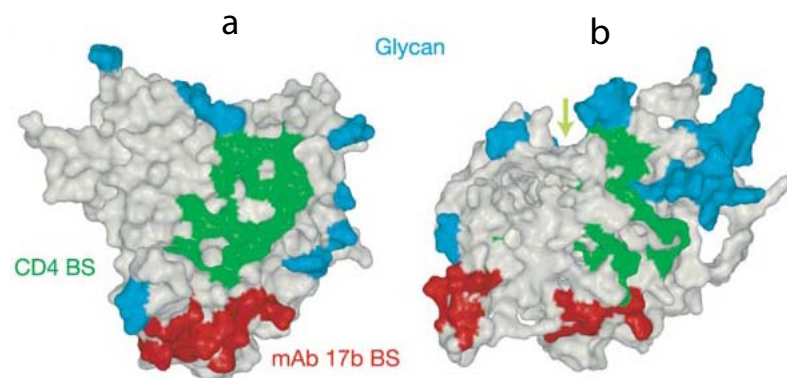


Abbildung 1.7: Vergleich Korezeptorbindungsstelle (rot) freies SIV gp120 (b) und CD4-gebundenes gp120 (a) [38]

In 2005 wurde von Kwong et al. eine Kristallstruktur von gp120 im Komplex mit D1D2 CD4 und dem X5-Antikörper publiziert, die den V3-Loop beinhaltet [40] (s. Abb 1.8). Allerdings wurden in der Sequenz von dem V3-Loop zwei Mutationen vorgenommen, um *N*-Glykosilierungsstellen aus dem Loop zu entfernen. Da der V3-Loop unter nativen Bedingungen *N*-glykosyliert vorliegt und ein Entfernen der Glykosilierung einen Wechsel von R5 nach X4 hervorruft [25] ist fraglich, inwieweit sich aus der Struktur detaillierte Rückschlüsse auf die Wechselwirkung mit dem Korezeptor ziehen lassen. Die Struktur mit dem elongierten V3-Loop ist in Übereinstimmung mit einem Zwei-Schritt-Interaktionsmodell zwischen gp120 und dem CCR5-Rezeptor, welches momentan in der Literatur favorisiert wird. Peptide, die dem V3-Loop entsprechen, wurden intensiv mit NMR-spektroskopischen Methoden untersucht [41, 42]. Neuere Untersuchungen beinhalten die Bindung von V3-Loop-Peptiden und nativem CCR5-Rezeptor, welcher auf Zellen expremiert wird [43]. Strukturelle Informationen zum CCR5-Rezeptor beschränken sich auf verschie-

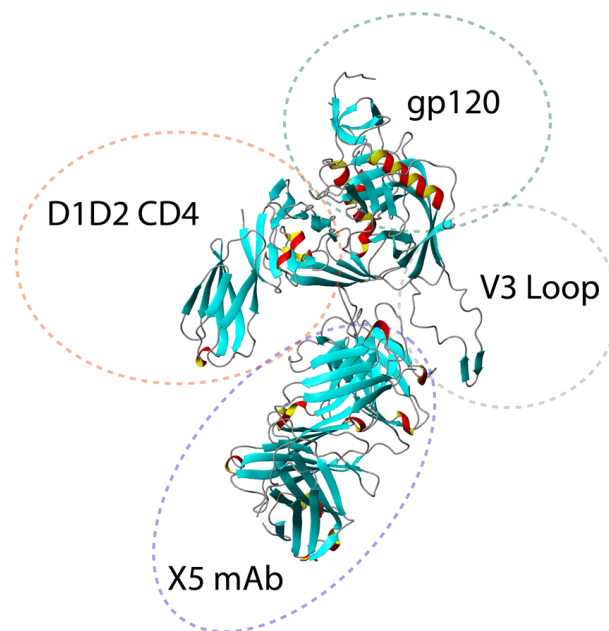


Abbildung 1.8: Kristallstruktur gp120/X5 mAb/ D1D2 CD4, PDB 2B4C, X5 ist ein CD4i-Antikörper der an die Korezeptorbindungsstelle am gp120 bindet (s. Abb. 1.7) Diese Abbildung wurde mit dem Programm Molmol erstellt [44]

dene Modellierungstudien ausgehend von der Rhodopsin-Struktur, allerdings besteht nur eine geringe Sequenzhomologie [45, 46, 47, 48, 49, 50]. Die Regionen des Korezeptors, die für den HIV-Eintritt wichtig sind, wurden durch die Analyse von

Chemokin-Rezeptor-Chimeren, *Site Directed mutants*, Vergleich von Rezeptor Homologen verschiedener Spezies und Anti-Korezeptor-Antikörpern untersucht [51, 52]. So ist der *N*-terminus und der zweite extrazelluläre Loop von entscheidender Bedeutung. Der *N*-terminus enthält verschiedene sulfatierte Tyrosinreste [53]. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass dem *N*-terminus eine entscheidene Bedeutung für den HIV-Eintrittsprozess zukommt. So zeigen Mutanten, in denen die Tyrosinreste gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden, eine deutlich verringerte Korezeptoraktivität [54, 55, 56, 57]. Ebenso wurde gezeigt, dass *N*-terminale sulfatierte Peptide die Funktion von einem verkürzten CCR5-Rezeptor wiederherstellen, nicht aber die unsulfierten Varianten [58]. Auch wurde eine direkte Wechselwirkung CCR5 *N*-terminaler-Peptide mit gp120 in Abhängigkeit von CD4 beschrieben [59]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass eine Klasse von CD4-induzierten Antikörpern sulfatiert vorliegt [60, 61]. Die Sulfatierung ist essentiell für die Bindung an gp120-CD4, wie durch Immunpräzipitationsexperimente gezeigt wurde. Die Bindung von den scFv an gp120 CD4 wird von einem sulfatierten *N*-terminalen CCR5 Peptid inhibiert. Daraus lässt sich folgern, dass die Bindung der Antikörper vergleichbar ist mit der Bindung von CCR5. Die sulfatierten Antikörper neutralisieren primäre Virusisolate besser als die nichtsulfierten Prototypen 17b und 48d. Demnach sollte es viel effektiver sein, Antikörper gegen die CD4-induzierten Epitope zu erzeugen, als bisher angenommen. Die Bedeutung der Sulfatierung zeigt sich darin, dass die Bindung zwischen gp120 und anderen Proteinen wie den Syndecans ebenfalls über ein sulfatiertes Motiv im Rezeptor vermittelt wird [62]. Weiterhin ist bekannt, dass der zweite extrazelluläre Loop wichtig für die Wechselwirkung mit dem gp120 ist. Auch hier wurden Untersuchungen mit synthetischen Peptiden durchgeführt. Lineare Peptide, welche den Loopsequenzen entsprechen, zeigen allerdings nur einen geringen Effekt [63]. Erfolgsversprechender ist der Ansatz, cyclisierte Peptide, welche die Loops nachahmen, zu synthetisieren [64]. Weitere Versuche, Peptidmimetika für den CCR5-Rezeptor zu entwickeln zeigen bislang wenig Erfolg [65, 66]. Bis jetzt gibt es keine experimentellen Strukturinformationen über den nativen trimeren Hüllproteinkomplex. Es existiert ein Modell eines gp120-Trimers, welches aufgrund vorhandener Kristallstrukturdaten erstellt wurde [67]. Über die genaue Wechselwirkung zwischen dem Hüllprotein und dem Korezeptor ist momentan jedoch nichts bekannt.

1.2.2 Entwicklung neuer Entry-Inhibitoren

Alle in Abschnitt 1.2 beschriebenen Proteininteraktionen können als Ziel für die Entwicklung neuer Inhibitoren verwendet werden. Es werden dabei folgende Klassen unterschieden:

- **Attachment-Inhibitoren**

Die Wechselwirkung zwischen CD4 und gp120 wird verhindert. Zielpunkt ist hierbei meistens die CD4-Bindungsstelle an dem gp120.

- **Korezeptor-Antagonisten**

Der Korezeptor wird durch Liganden blockiert. Je nach Korezeptor unterscheidet man zwischen CCR5-Antagonisten und CXCR4-Antagonisten, wobei die Entwicklung der CCR5-Antagonisten am weitesten fortgeschritten ist.

- **Fusionsinhibitoren**

Der Fusionschritt wird unterbunden. Seit 2003 gibt es mit dem T-20 einen zugelassenen Wirkstoff [68]. Es handelt sich um ein 36mer Peptid, welches einer linearen Sequenz aus der HR2-Region des gp41 entspricht. Der genaue Mechanismus der Entry-Inhibition wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Nach einer weitverbreiteten Meinung bindet das Peptid an das gp41, so dass keine fusiosaktive Form ausgebildet werden kann [69, 70]. In neuerer Zeit häufen sich allerdings Hinweise, dass das T-20 kein stabiles sechs-helix-bundle ausbilden kann [71]. Auch wird eine direkte Wechselwirkung des T-20 mit dem gp120 von CXCR4-Viren beschrieben [72].

Alle diese verschiedenen Klassen werden unter dem Oberbegriff *Entry-Inhibitoren* zusammengefasst. In Tab. 1.1 wird ein Überblick über die aktuelle Entwicklung in dieser neuen Wirkstoffklasse gegeben [73]. Obwohl die Klasse der CCR5-Antagonisten einen Schwerpunkt in der Erforschung neuer Entry-Inhibitoren darstellt gibt es in dieser Substanzklasse eine Reihe von Problemen. So mußte 2005 die Entwicklung von Aplaviroc, einem CCR5-Antagonisten von GlaxoSmithKline, wegen des Auftretens einiger Fälle von lebensdrohlicher Lebertoxizität eingestellt werden. Da momen-

Tabelle 1.1: Übersicht HIV-Eintrittsinhibitoren [73]

Verbindung	Hersteller	Mechanismus	Phase
BMS-488043	Bristol-Myers	bindet an gp120	II
Pro 542	Progenics	bindet an gp120	II
TNX-355	Tanox/Biogen	bindet an CD4	II
SCH-D	Schering	bindet an CCR5	II
Pro-140	Progenics	bindet an CCR5	I
Tak-652	Takeda	bindet an CCR5	
GW873140	Glaxo SmithKline	bindet an CCR5	II
UK-427,857	Pfizer	bindet an CCR5	II/III
AMD070	AnorMED	bindet an CXCR4	
KRH-2731	Kureha	bindet an CXCR4	präklinisch
Fuzeon,T20	Trimeris	bindet an gp41	Verwendung

tan nicht klar ist, ob diese Lebertoxizität ein Klassenproblem darstellt, stehen alle CCR5-Antagonisten unter verstärkter Beobachtung auf mögliche Leberschädigungen. Zusätzlich wurde eine klinische Studie von Vicriviroc, einem CCR5-Antagonisten von Schering-Plough, wegen unzureichender Wirkung vorzeitig beendet. Eine weitere Hauptsorge ist vor allem, dass die Blockade eines zellulären Rezeptors negative Auswirkungen haben kann. So ist z.B. bekannt, dass der CXCR4 Rezeptor eine wichtige Rolle in der fetalen Entwicklung spielt [74]. Eine vielversprechende und bis jetzt wenig untersuchte Möglichkeit dieses Problem zu vermeiden liegt in der Blockade der Korezeptorbindungsstelle im gp120. Hierbei kommt den CD4i-Epitopen eine entscheidene Bedeutung zu, da diese teilweise mit der CCR5-Bindungsstelle überlappen [75, 76]. Da die CCR5-Bindungsstelle stark konserviert vorliegt wäre eine breite Neutralisationseigenschaft von R5-Viren zu erwarten. Die CD4-induzierten Epitope sind vornehmlich durch Antikörper charakterisiert [77]. Die Prototypen für diese Klasse von Antikörpern sind der 17b- und der 48d- Antikörper [78]. Der 17b-Antikörper wurde auch für die erste Kristallstruktur eines gp120-CD4-Komplexes verwendet [31]. Allerdings zeigen die vollständigen Antikörper keine Reduzierung von HIV-Infektionen *in vivo*, da die CD4-induzierten Epitope in unmittelbarer Nähe der Zelle ausgebildet werden und daher für die Antikörper schlecht zugänglich sind

[79]. *Single Chain*-Varianten zeigen allerdings eine gewisse Aktivität *in vivo*. Die Entwicklung und Charakterisierung von Liganden für die CD4-induzierten Epitope sollte demnach ein lohnendes Ziel darstellen. Dass dieser Ansatz erfolgsversprechend ist wurde von Berger et al. gezeigt, die eine sCD4-17b-Chimäre hergestellt haben [80]. Damit konnten sie unterschiedliche HIV-Varianten im nanomolaren Bereich inhibieren. Bei diesen Konzentrationen zeigte keines der Proteine für sich allein eine Wirkung.

1.3 Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Synthese und NMR-spektroskopischen Untersuchung von Peptiden, die an die CD4-induzierten Epitope im gp120 binden. Durch die hohe Konservierung dieser Epitope in verschiedenen HIV-Stämmen wäre eine breite Neutralisationseigenschaft zu erwarten. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass ein virales Protein das Zielmolekül darstellt und es damit nicht zu möglichen Problemen kommt, die durch die Blockade eines zellulären Rezeptors ausgelöst werden. Zum einen wurden Sequenzen, die vom Kooperationspartner im Georg-Speyer-Haus (Frankfurt) aus phage-display screenings erhalten wurden, synthetisiert. Weiterhin werden Peptide, die vom *N*-terminus von CCR5 abgeleitet sind, als Kontrollpeptide verwendet. Ziel ist hierbei die Bestimmung der Konformationen der Peptide im gebundenen Zustand mittels NMR-Spektroskopie.

Kapitel 2

Peptidsynthese

Seit der Einführung der Festphasenpeptidsynthese 1963 von Bruce Merrifield [81] hat sich die Technik zu einem unverzichtbaren Standardverfahren entwickelt, wofür Merrifield 1984 der Nobelpreis verliehen wurde. Durch die Entwicklung der kombinatorischen Chemie sind mittlerweile auch eine Vielzahl organischer Reaktionen an fester Phase durchgeführt worden [82]. Der generelle Ablauf der Festphasenpeptidsynthese ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die grundsätzliche Idee besteht darin, dass der Aufbau des Peptides an einem festen Trägermaterial durchgeführt wird. Im allgemeinen werden hierfür Harze auf Polystyrolbasis (PS) verwendet. Je nach Anforderungen gibt es eine Vielzahl maßgeschneiderter Polymere, die die gewünschten Anforderungen erfüllen. Desweiteren stehen dem Anwender verschiedenartige Linker zur Verfügung. Die Festphasensynthese ist aber nicht auf die Verwendung von Harzen beschränkt. So werden z.B. Cellulosemembranen für die Spotsynthese von Peptiden verwendet [83]. Die Idee, das Syntheseprodukt und die Reaktanden auf zwei unterschiedliche Phasen zu verteilen wird mittlerweile auch auf andere Art und Weise realisiert. So gibt es Syntheseverfahren für kleine Peptide, in denen das Peptid in wässriger Phase synthetisiert wird und Reagenzien durch Extraktionsschritte mit organischem Lösungsmittel abgetrennt werden [84]. Weitere Ansätze benutzen perfluorierte Verbindungen [85] oder ionischen Flüssigkeiten als Trägermaterialien [86]. Mittlerweile lassen sich Peptide mit einer Länge von 50 Aminosäuren routinemäßig herstellen. Die schrittweise Synthese längerer Peptide mit bis zu 100 Aminosäuren erfordert spezielle Optimierung. Für die Synthese dieser kleinen Proteine wurde die

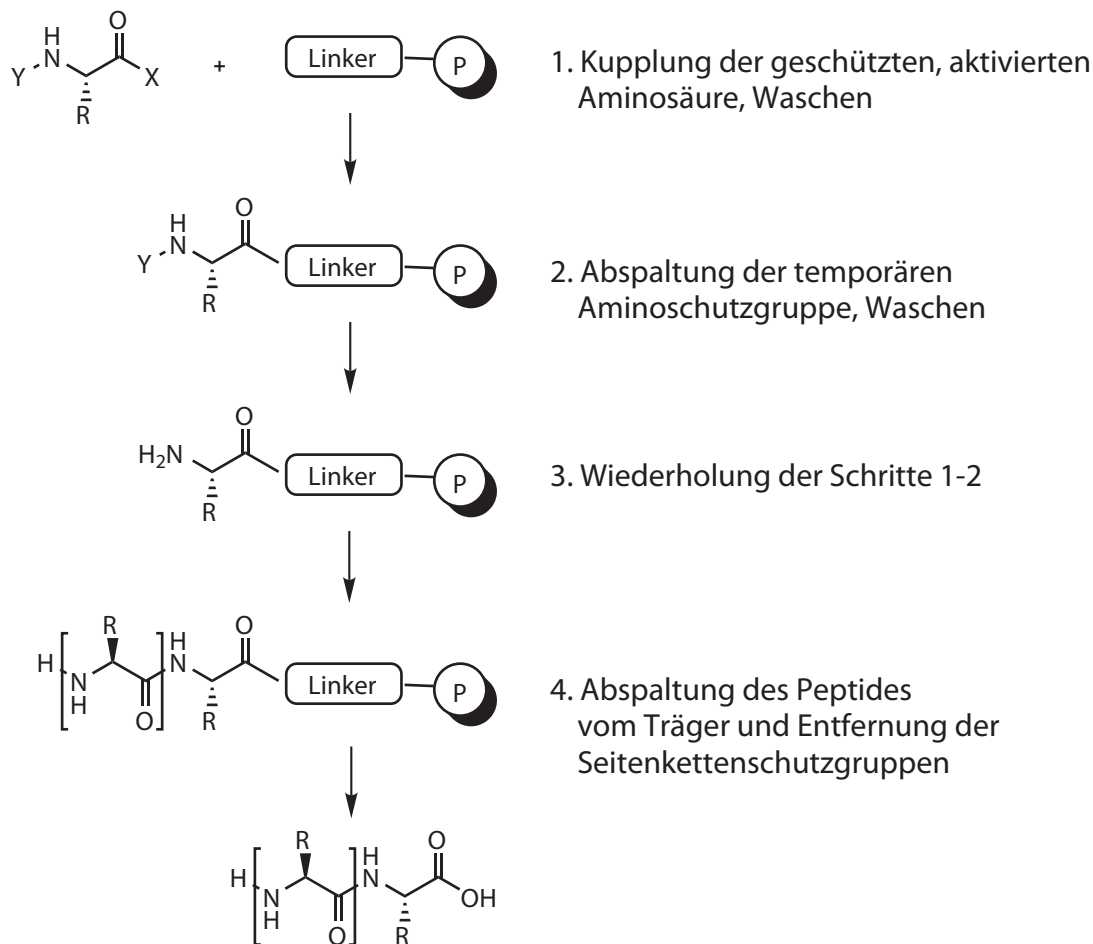


Abbildung 2.1: Ablauf der Festphasenpeptidsynthese

Y = temporäre Schutzgruppe, X = Aktivierung, R = Seitenkette

Segmentkupplung entwickelt, in welcher kürzere lineare Peptide zu größeren Einheiten gekuppelt werden.

2.1 Schutzgruppenstrategien

In der Festphasenpeptidsynthese haben sich zwei unterschiedliche Schutzgruppenstrategien etabliert. Dies ist zum einen die BOC/Benzyl- und zum anderen die Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie. Die BOC-Schutzgruppe wurde ursprünglich von Carpino eingeführt [87]. Die Boc/Benzyl-Strategie beruht auf einer abgestuften Säurelabilität der verwendeten Schutzgruppen. Hierbei ist die BOC-Gruppe die temporäre Aminoschutzgruppe welche mit Trifluoressigsäure (TFA) entfernt wird. Sowohl die Seitenkettenschutzgruppen als auch der Linker sind vom Benzyltyp und werden durch

starke Säuren wie Fluorwasserstoff (HF) oder Trifluormethansulfonsäure (TFM-SA) entfernt. Einen entscheidenden Fortschritt in der Festphasensynthese stellt die

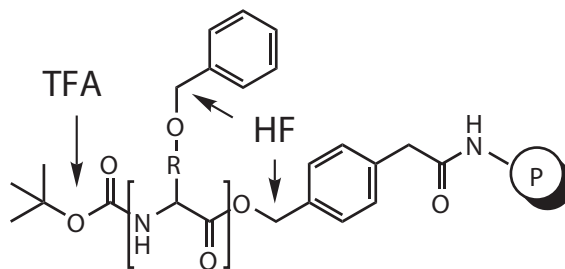


Abbildung 2.2: Boc/Benzyl-Strategie

Einführung der Fmoc-Schutzgruppe dar. Ursprünglich wurde sie von Carpino entwickelt [88], allerdings erfolgte ihre Anwendung und Etablierung in der Festphasensynthese durch Atherton et al. und Meienhofer et al. [89, 90]. In diesem Fall findet

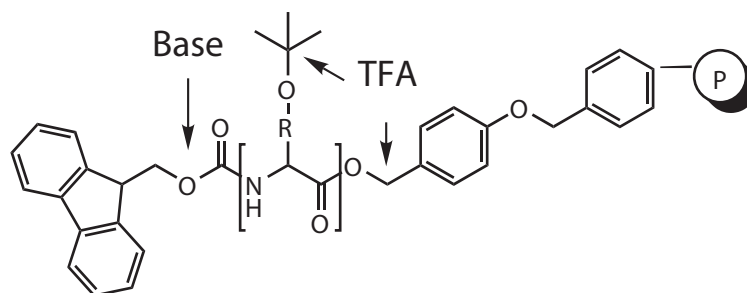


Abbildung 2.3: Fmoc/t-Bu-Strategie

die Abspaltung der temporären Schutzgruppe nach einem vollständig anderen Mechanismus statt, weshalb man auch von einer orthogonalen Schutzgruppe spricht. Die Fmoc-Gruppe wird durch die Einwirkung von Basen nach einem E1cB-Mechanismus abgespalten. Im ersten Schritt wird das Proton entfernt und es entsteht die konjugierte Base (cB). Im zweiten Schritt erfolgt die Abspaltung des Dibenzofulvens, welches von der überschüssigen Base abgefangen wird. In Abb. 2.4 ist die Abspaltung abgebildet. Das entstehende Dibenzofulven-Piperidin-Addukt hat ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 301 nm, wodurch sich die Abspaltung gut im UV verfolgen lässt und damit auch die Kupplungseffizienz beurteilt werden kann. Die Seitenkettenschutzgruppen sind vom *t*-Butyl-Typ. Dies hat den Vorteil, dass sich die Seitenkettenschutzgruppen und die Abspaltung des Peptides vom Harz durch TFA bewerkstelligen lässt. Obwohl Studien zeigen, dass beide Syntheseme-

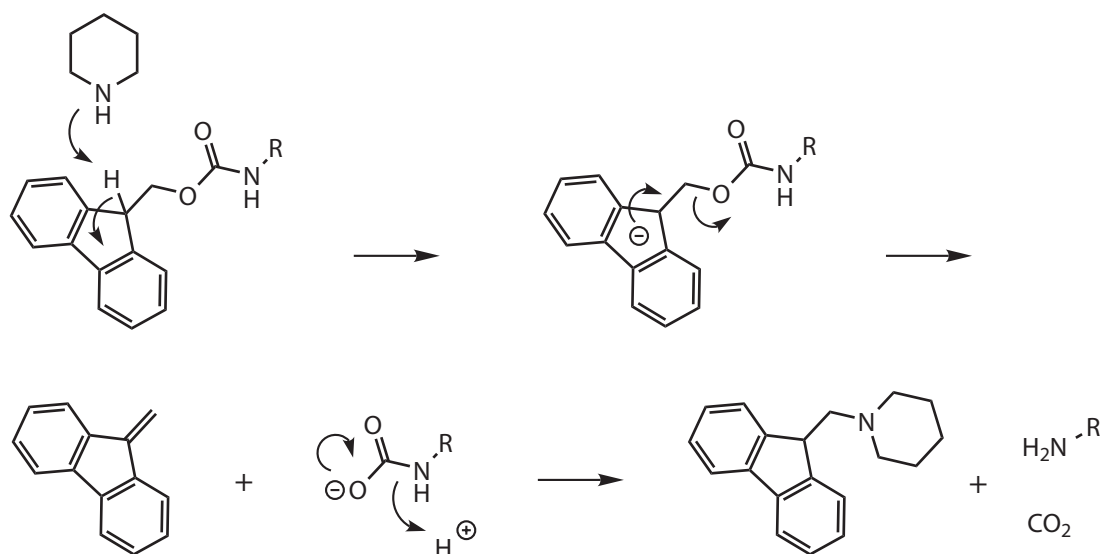


Abbildung 2.4: Mechanismus der Fmoc-Abspaltung

thoden zu vergleichbaren Ergebnissen führen, wird heute zum überwiegenden Teil aufgrund der einfacheren praktischen Handbarkeit die Fmoc-Strategie verwendet.

2.2 Kupplungsreagenzien

Für die Knüpfung der Peptidbindung muss die Carboxylatgruppe in ein reaktives Derivat überführt werden. In der Abb. 2.5 sind die gebräuchlichsten Aktivierungsmethoden aufgelistet [91]. Normalerweise findet die Bildung des Aktivesters *in situ* statt. Eine wesentliche Anforderung an die Kupplungsbedingungen besteht darin, dass die Reaktion zu einer möglichst geringen Racemisierung führt. Dies hängt wesentlich von der Aminosäure ab. So sind Cystein [92] und Histidin besonders racemisierungsgefährdet. Durch den Zusatz von Hilfsreagenzien wie HOBt zur Aktivierung lässt sich die Racemisierung normalerweise auf unter 1% reduzieren [93]. Sehr weit verbreitet sind z.B. die Di-isopropylcarbodiimid (DIC)/HOBt-Aktivierung und die HBTU /HOBt-Aktivierung, welche auch hauptsächlich in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Kupplung sterisch sehr anspruchsvoller Aminosäurederivate erfordert meistens besonders reaktive Aktivierungsreagenzien wie z.B. HATU oder TFFH [94]. Bei der Aktivierung mit den uroniumbasierten Reagenzien darf das Aktivierungsreagenz nicht im Überschuß zur Aminosäure eingesetzt werden. Ansonsten besteht die Gefahr, dass die Aminogruppe am Harz durch das Aktivierungsreagenz

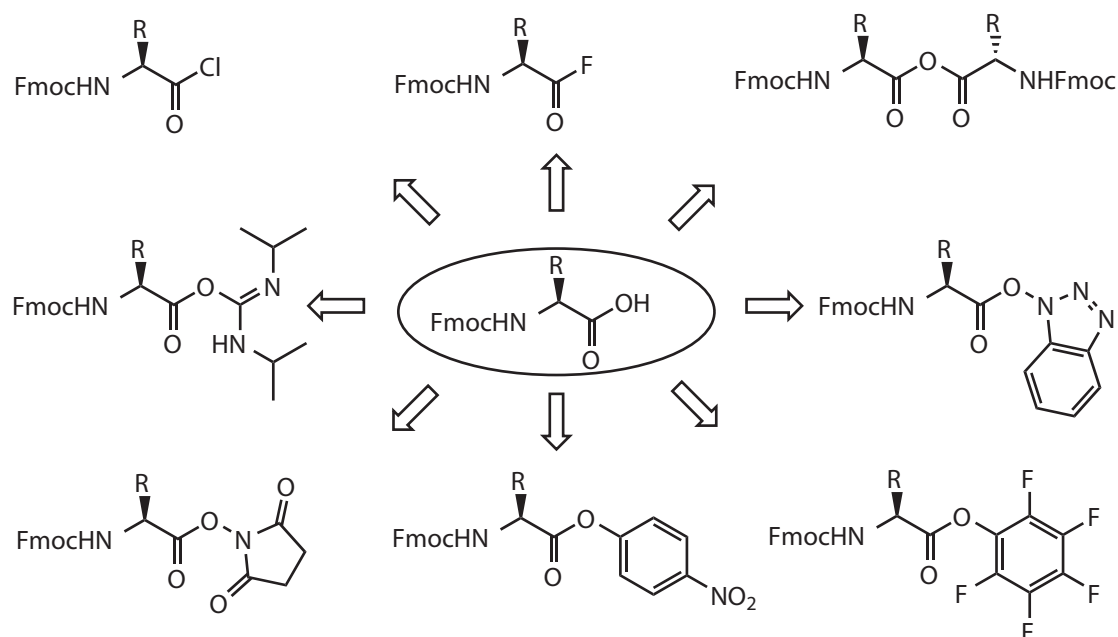


Abbildung 2.5: Aktivierungsreagenzien

guanidiliert wird, was zu einem Abbruch der Synthese führt. Es gibt verschiedene Möglichkeiten den Erfolg der Kupplung zu kontrollieren [95]. Zum einen lässt sich die Fmoc-Abspaltung im UV kontrollieren, wodurch eine quantitative Bestimmung der Kupplungsausbeute möglich ist. Andere Methoden beruhen auf dem Anfärben des Harzes mit einem Indikator wie Bromphenolblau [96]. Falls noch freie Aminogruppen am Harz vorliegen kommt es zu einer Säure-Base-Reaktion und einem Farbumschlag von gelb nach blau. Die Farbänderung ist allerdings bei längeren Sequenzen nicht mehr gut zu erkennen. Eine weitere Methode ist der Kaiser-Test [97]. Hierbei werden freie Aminogruppen am Harz mit Ninhydrin angefärbt. Der Test ist entweder in qualitativer oder in quantitativer Form ausführbar. Die sicherste Methode besteht in der Abspaltung einer kleinen Harzmenge und direkter Analyse der Produkte mittels HPLC/MS.

2.3 Nebenreaktionen

Insgesamt sind ca. 50 Nebenreaktionen in der Peptidsynthese beschrieben, von denen allerdings nur eine geringe Zahl ein ernstes Problem im Laboralltag darstellt [93]. Eine wichtige Nebenreaktion ist die Aspartimidbildung [98]. Die Tendenz zur Aspartimidbildung hängt stark von der vorangehenden Aminosäure ab. So tritt die Nebenreaktion bei Asp-Gly, Asp-Ser und Asp-Asn sehr häufig auf. Das Auftreten dieser Sequenzen innerhalb eines Peptides erfordert eine spezielle Schutzgruppenstrategie, um die Nebenreaktion zu unterdrücken. So lässt sich durch die Verwendung sterisch anspruchsvoller Schutzgruppen für Asparagin die Cyclisierung weitestgehend unterbinden. Einen vollständigen Schutz bietet z.B. die 4-Hydroxymethylbenzoesäure (Hmb-) Schutzgruppe für die vorangehende Aminosäure. Ein weiteres Beispiel für ungewollte Cyclisierungsreaktionen stellt die Diketopiperazinbildung bei *C*-terminalen Prolinresten dar. Durch die Verwendung entsprechender Amidharze lässt sich dieses Problem unterbinden. Ein Problem in der Festphasensynthese besteht in dem Auftreten unvollständiger Kupplungen. Diese treten vor allem bei der Synthese sogenannter „schwieriger Sequenzen“ auf. Dadurch erhält man Rumpfsequenzen, die sich von der gewünschten Sequenz nur gering unterscheiden. Dementsprechend hoch sind die Anforderungen an die chromatographischen Trennmethode. Eine Möglichkeit dieses Problem zu reduzieren besteht in der Durchführung eines sogenannten „Capping Schrittes“. Hierbei wird nach der eigentlichen Kupplung noch ein Acetylierungsschritt eingefügt, welcher die nicht umgesetzten Aminogruppen absättigt. Gegebenenfalls kann das Zielpeptid im letzten Schritt mit einem „Tag“ versehen werden, welcher die chromatographische Auftrennung erleichtert.

2.4 Sulfatierte Peptide

Die posttranslationale Modifizierung von Tyrosin als Sulfatester wurde zuerst für das bovine fibrinopeptide B im Jahr 1954 beschrieben [99]. Es wird angenommen, dass die Tyrosin *O*-Sulfatierung ein Bestandteil der normalen Zellphysiologie ist und dass bis zu 1% der gesamten Proteine eines Organismus diese Modifikation besitzen. Ein bedeutender Fortschritt für das Verständnis dieser Modifikationen stellte die

Identifizierung und Klonierung der Tyrosylprotein-Sulfotransferase (TPPST-1) dar [100, 101]. Mitterweile sind zwei Enzyme bekannt, welche die Tyrosinsulfatierung durchführen [102]. Bis heute sind 62 Proteine bekannt, in denen diese Tyrosinmodifizierung vorliegt [102]. In den meisten Fällen ist die biologische Funktion der Sulfatierung allerdings nicht bekannt. Sehr intensiv sind biologisch aktive Peptide wie Neurohormone der Gastrin / Cholecystokinin (CCK-)- Familie untersucht wurden. Im Falle der CCK-Peptide ist die Tyrosin *O*-Sulfatierung essentiell für die Auslösung der vollen hormonellen Antwort. Durch die Feststellung, dass der Chemokinrezeptor CCR5 Tyrosin *O*-sulfatiert vorliegt, ist das Interesse an dieser Modifikation deutlich gewachsen. So liegen auch andere Chemokinrezeptoren wie CCR2 und CCR4 sulfatiert vor und einige Autoren spekulieren, dass die Tyrosin *O*-Sulfatierung ein wichtiges funktionelles Merkmal vieler Chemokinrezeptoren darstellt. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass eine neue Klasse von CD4-induzierten Antikörpern, welche von HIV infizierten Testpersonen isoliert wurden ebenso diese Modifikation aufweisen [60, 61]. Inwiefern die Tyrosin *O*-Sulfatierung mit der humoralen Antwort des Immunsystems zusammenhängt, lässt sich aufgrund der Datenlage nur vermuten. Ein wesentlicher Grund für den vergleichsweise geringen Kenntnisstand über sulfatierte Peptide ist der schlechte synthetische Zugang dieser Peptide. Der Tyrosin *O*-Sulfatester ist zwar unter basischen Bedingungen stabil, wird aber unter sauren Bedingungen sehr schnell abgebaut.

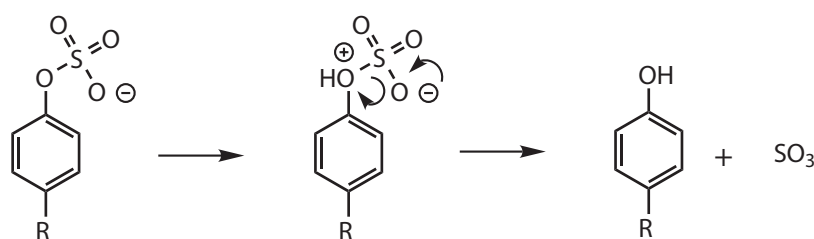


Abbildung 2.6: Zersetzung von Arylmonosulfaten unter sauren Bedingungen [103]

Die Ursache für die Säurelabilität liegt vermutlich in dem amphoteren Ion $\text{ArO}^+\text{H}\text{SO}_3^-$, welches sich schnell in ArOH und SO_3 zersetzt [103]. Dies stellt die Festphasensynthese solcher Peptide vor enorme Herausforderungen. So wird der überwiegende Teil der für die Peptidsynthese verwendeten Linker unter sauren Bedingungen gespalten. Desweiteren sind die Seitenkettenschutzgruppen in der Fmoc-Chemie meis-

tens Gruppen auf *t*-Butyl-, Boc- oder Trityl- Basis. Die Entdeckung der sulfatierten CCK-Peptide hat einen starken Impuls für die Entwicklung neuer Synthesemethoden hervorgerufen. Tatsächlich wurde die Methodenentwicklung hauptsächlich anhand dieser CCK-basierten Peptide vorangetrieben. Grundsätzlich gibt es drei Möglichkeiten für die Synthese sulfatierter Peptide:

1. Sulfatierung des fertigen Peptides

Das Peptid wird entweder mit ungeschützter Tyrosinseitenkette bzw. mit einer im Vergleich zu den anderen Seitenkettenschutzgruppen und dem Linker orthogonalen Schutzgruppe synthetisiert [104]. Anschließend wird das Peptid am Harz mit einem Sulfatierungsreagenz wie z.B. DMF-SO₃ oder Pyridin-SO₃ behandelt [105]. Weiterhin ist auch eine Sulfatierung des abgespaltenen Peptides in Lösung möglich [93]. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass die Peptidsynthese mit den nichtsulfatierten Bausteinen deutlich besser funktioniert. Allerdings müssen die entsprechend orthogonal geschützten Tyrosinbausteine erst synthetisiert werden [104]. Der direkte Einbau von Tyrosinresten mit ungeschützten Seitenketten ist zwar möglich, birgt aber das Risiko von Nebenreaktionen. So kann es im Verlauf der Synthese zu einer Acylierung der Hydroxylgruppe kommen.

2. Einbau von Tyrosin-*O*-Sulfat

Der Tyrosinrest wird direkt als Tyrosin-*O*-sulfat eingebaut. Der Nachteil der Methode besteht darin, dass die Kupplungen mit diesem Salz nicht so effizient durchführbar sind. Die Herstellung des sulfatierten Tyrosins ist allerdings sehr einfach durchführbar. Auch sind in den letzten Jahren verschiedene Tyrosin *O*-Sulfatsalze käuflich erhältlich geworden.

3. Enzymatische Sulfatierung

Ein nichtsulfatiertes Peptid wird mit Hilfe von Enzymen sulfatiert [106]. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass sich die Selektivität der Sulfatierung nur bedingt kontrollieren lässt. Die Herstellung eines partiell Tyrosin *O*-sulfatierten Peptides wurde in neuester Zeit für ein CXCR4 *N*-terminal abgeleitetes Peptid gezeigt [107]. Auch sind die benötigten Enzyme nicht kom-

merziell erhältlich. Der Vorteil liegt darin, dass die Reaktion unter sehr milden, nativen Bedingungen durchgeführt wird.

Der entscheidende Schritt in der chemischen Synthese besteht aber in der Abspaltungsreaktion vom Harz. Die hohe TFA-Konzentration führt zu einer Abspaltung des Sulfatrestes. Kitagawa et al. haben gezeigt, dass die Temperatur einen entscheidenden Einfluß auf die Reaktion hat. So bleibt bei einer Temperatur von 0°C der größte Teil des Sulfatesters erhalten, während die Seitenkettenschutzgruppen weiterhin entfernt werden [108]. Auch können bestimmte Arten von Abfangreagenzien wie z.B. Ethandithiol die Entfernung des Sulfatrestes fördern [109]. Weiterhin hat das Gegenion des Sulfatrestes einen starken Einfluß auf die Abspaltung. Die Stabilität der Sulfatierung wird ebenfalls durch die Sequenz beeinflusst [110]. So hat die Gegenwart von Arginin durch die Ausbildung eines inneren Salzpaars eine stabilisierende Auswirkung. Insbesondere große organische Kationen wie Tetra-*N*-butylammonium stabilisieren den Sulfatrest im Vergleich zu einfachen anorganischen Kationen wie Na, Ba [111].

Kapitel 3

NMR-Spektroskopie von Protein/Ligand-Komplexen

Die NMR-Spektroskopie ist unter anderem besonders für die Charakterisierung von Ligand/Protein-Komplexen in Lösung geeignet [112]. Für die Untersuchung von schwachbindenden Liganden, die sich im schnellen Austausch zwischen freier und komplexierter Form befinden, werden die sogenannten transfer-NOE (tr-NOE)- bzw. transfer-CCR (tr-CCR)-Experimente verwendet. In Abb. 3.1 ist das Prinzip dieser Experimente dargestellt. Die Experimente beruhen auf der Tatsache, dass sowohl

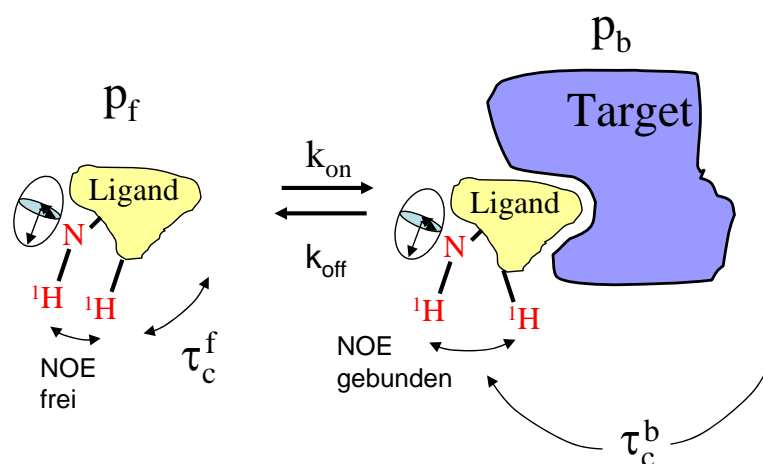


Abbildung 3.1: transfer NOE-Experiment

p_f molarer Anteil freier Ligand, p_b molarer Anteil gebundener Ligand, τ_c^f globale Korrelationszeit freier Ligand, τ_c^b globale Korrelationszeit gebundener Ligand

die Kreuzrelaxationsrate als auch die kreuz-korrelierte Relaxationsrate in linearer Weise von der globalen Korrelationszeit des Moleküls abhängen. Die globale Korrelationszeit ist proportional zum Molekulargewicht des Komplexes. Durch den großen Unterschied in der Korrelationszeit wird das beobachtete NMR-Signal von dem gebundenen Zustand dominiert. Der Effekt im gebundenen Zustand wird auf die beobachteten Signale der freien Form transferiert. Obwohl der freie Ligand im großen Überschuß vorliegt, dominieren die Signale des gebundenen Zustands. Der Überschuß an Liganden hängt zum einen von der Affinität des Liganden und zum anderen von der Korrelationszeit und damit von dem Molekulargewicht des beobachteten Komplexes ab. Üblicherweise liegt der Ligand in 100fachen Überschuß vor. Bei sehr großen Systemen wie dem Ribozym oder gar ganzen Virenpartikeln muß der Überschuß auf bis zu 1000fach erhöht werden. Während der freie Ligand positive NOEs zeigt, sind die tr-NOEs stark negativ. Aus dem Unterschied in den Vorzeichen lässt sich direkt erkennen, ob ein transfer-NOE-Effekt vorliegt oder nicht. Die Bedingungen, ob sich das System im schnellen Austausch befindet, sind für das tr-NOE und das tr-CCR Experiment unterschiedlich. Im tr-NOE-Experiment muß die *off-rate* größer als die longitudinale Relaxationszeit T_1 sein, während im tr-CCR Experiment die *off-rate* größer als die transversale Relaxationszeit T_2 sein muß. [113].

$$\frac{\left(\frac{1}{T_1}\right) + \Gamma}{k_{off}} \ll 1 \quad (3.1)$$

$$\frac{\left(\frac{1}{T_2}\right) + \Gamma_{ccr}}{k_{off}} \ll 1 \quad (3.2)$$

Dies bedeutet für die NMR-Messungen, dass die *off-rate* bei der tr-CCR Messung ungefähr um einen Faktor 10 höher sein muss als beim tr-NOE-Experiment. Im Gegensatz zur Kreuzrelaxation ist die kreuz-korrelierte Relaxationsrate nicht durch Spindiffusion beeinträchtigt. Aus der kreuz-korrelierten Relaxationsrate kann man Informationen über Dihedralwinkel zwischen den beobachteten Gruppen erhalten [114]. Ein weiterer Vorteil ist, dass die kreuz-korrelierte Relaxationsrate im Gegensatz zum tr-NOE nicht durch systematische Fehler wie chemische Austauschprozesse beeinträchtigt wird. Für Peptide stellt die kreuz-korrelierte Relaxationsrate zwischen dem N-H Dipol und der chemischen Verschiebungsanisotropie des Stickstoffes $\Gamma^{N,NH}$

ein gut geeignetes Interaktionspaar dar. Für die Berechnung dieser Rate werden Informationen über den ^{15}N CSA-Tensor und die spektrale Dichtefunktion benötigt. Informationen über den ^{15}N CSA-Tensor sind durch Festkörper NMR-Spektroskopie [115], ^{15}N Relaxationsmessungen in Lösung [116] oder quantenmechanische Berechnungen [117] erhältlich.

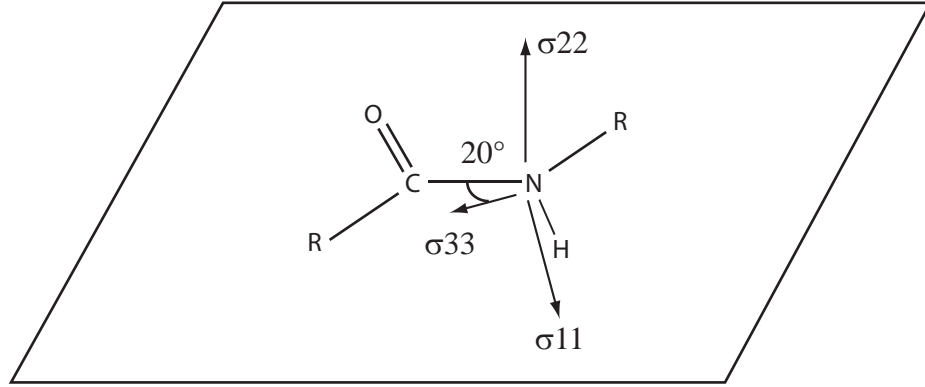


Abbildung 3.2: Orientierung des CSA-Tensors in einem Peptid,

σ_{11} und σ_{33} liegen in der Peptidebene, während σ_{22} orthogonal zur Peptidebene steht. σ_{11} ist die Hauptachse des CSA-Tensors

Für ein isotrop rotierendes Molekül hat die spektrale Dichtefunktion folgende Form:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{\tau_c}{1 + \tau_c^2 \omega^2} \right] \quad (3.3)$$

Neben dieser Beschreibung der globalen Reorientierung des Makromoleküls ist auch eine Kenntnis der internen Dynamik wichtig, da hierdurch die kreuz-korrelierte Relaxationsrate niedriger ausfällt, als aufgrund der globalen Korrelationszeit zu erwarten wäre. Die interne Beweglichkeit wird durch den modellfreien Lipari-Szabo-Formalismus beschrieben [118].

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[S^2 \frac{\tau_c}{1 + \tau_c^2 \omega^2} + (1 - S^2) \frac{\tau_e}{1 + \tau_e^2 \omega^2} \right] \quad (3.4)$$

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_i} \quad (3.5)$$

Hierbei wird die interne Dynamik durch den Ordnungsparameter S und eine interne Korrelationszeit τ_i beschrieben. Der Ordnungsparameter nimmt die Werte

$0 \leq S^2 \leq 1$ an. Die Rate für die kreuz-korrelierte Relaxation zwischen der ^{15}N - ^1H dipolaren Wechselwirkung und der ^{15}N chemischen Verschiebungsanisotropie wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Gamma^{N,NH} = -\frac{2\tau_c}{5}b_{kl}\gamma_N B_0 \left\{ \frac{(\sigma_{xx} - \sigma_{zz})\cos^2\theta x - 1}{3} + \frac{(\sigma_{yy} - \sigma_{zz})\cos^2\theta y - 1}{3} \right\} \quad (3.6)$$

$$b_{kl} = \frac{\mu_0\gamma_N\gamma_H\hbar}{4\pi r_{NH}^3} \quad (3.7)$$

Hierbei wird nur der $J(0)$ Anteil der spektralen Dichte berücksichtigt. Der $J(\omega)$ Ausdruck wird aufgrund seines äußerst geringen Beitrages vernachlässigt. Die Korrelationszeit für das freie Peptid lässt sich anhand der gemessenen Rate ermitteln. Für den Komplex lässt sich die Korrelationszeit über die Stokes-Einstein Gleichung berechnen.

$$\tau_m = \frac{1}{6D_{rot}} = \frac{\eta V_h}{kT} \quad (3.8)$$

Der hydrodynamische Radius kann für ein globuläres Protein über das Molekulargewicht abgeschätzt werden. Alternativ kann die Korrelationszeit direkt aus dem Diffusionskoeffizienten ermittelt werden, welcher z.B. durch dynamische Lichtstreuung bestimmt werden kann. Durch die Zunahme der CCR-Rate in der Mischung im Vergleich zum freien Peptid kann auch die Dissoziationskonstante des Komplexes abgeschätzt werden. Aufgrund der linearen Abhängigkeit der kreuz-korrelierten Relaxationsrate von der Korrelationszeit gilt:

$$\Gamma^{N,NH} = -\frac{2}{5}b_{kl}\gamma_N B_0 \left\{ \frac{(\sigma_{xx} - \sigma_{zz})\cos^2\theta x - 1}{3} + \frac{(\sigma_{yy} - \sigma_{zz})\cos^2\theta y - 1}{3} \right\} (\tau_f p_f + \tau_b p_b) \quad (3.9)$$

Der molare Anteil des Komplexes lässt sich folgendermaßen beschreiben.

$$p_b = 1 - p_f \quad (3.10)$$

Mit der Kenntnis der entsprechenden Korrelationszeiten für den freien Liganden und den Komplex lässt sich der Anteil p_b und damit die Dissoziationskonstante K_d des

In dem Kreuzexperiment werden in dem *constant time* Element die beiden 180° Pulse auf den Protonenkanal weggelassen. Durch den einen 180° Puls auf den Stickstoff wird die Kopplung refokussiert und es findet nur Magnetisierungstransfer über die kreuz-korrelierte Relaxation statt. Für das Kreuzexperiment erhält man folgende Transferfunktion:

$$N_y \xrightarrow[\frac{\Gamma_{N,NH}}{4\tau}]{} 2N_y H_z \sinh(\Gamma_{N,NH} 4\tau) \quad (3.12)$$

Aus dem Peakverhältnis im Kreuzexperiment zum Referenzexperiment lässt sich direkt die Rate bestimmen:

$$\frac{I^{cross}}{I^{ref}} = \frac{\sinh \Gamma_{N,NH} 4\tau}{\sin(\pi J \Delta')} \quad (3.13)$$

$$\Gamma_{N,NH} = \frac{1}{4\tau} \operatorname{arcsinh} \left(\frac{I^{cross}}{I^{ref}} * \sin(\pi J \Delta') \right) \quad (3.14)$$

Diese Art von tr-CCR Experimenten wurden unter anderem zur Strukturaufklärung von Peptiden im gebunden Zustand [121], Bestimmung der Zuckerkonformation in RNA [122], Mechanismus der H_2 Dehydrogenase [123] und zur Bestimmung der Tubulin-gebundenen Konformation von Epothilon verwendet [124]. Eine weitere Methode zur Untersuchung von Ligand Protein Wechselwirkungen sind die Sättigungs-Transfer-Differenz (STD) NMR-Experimente [125]. In Abb. 3.4 ist das allgemeine Prinzip dargestellt.

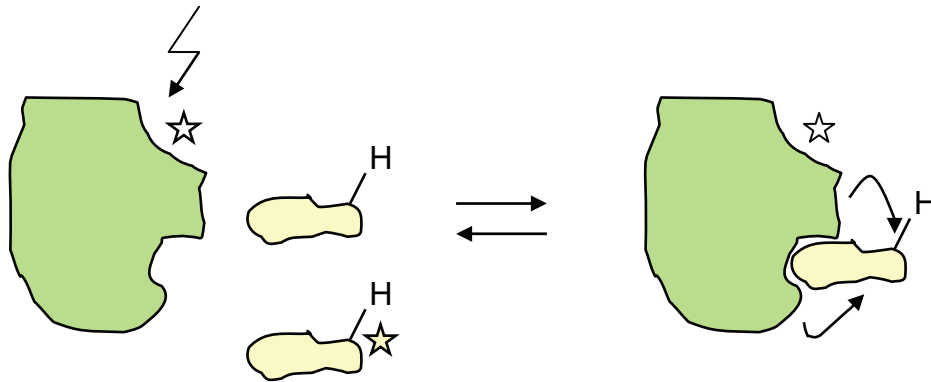


Abbildung 3.4: Sättigungs-Transfer-Differenz (STD) NMR

Hierbei werden die Proteinkerne in einem ^1H -NMR-Experiment selektiv gesättigt. Die Einstrahlfrequenz wird dabei so gewählt, dass keine Resonanzen des Liganden betroffen sind. Durch Spindiffusion wird eine komplette Sättigung der Proteinkerne erreicht. Ein gebundener Ligand wird ebenfalls gesättigt. Durch Dissoziation wird dieser Sättigungseffekt auf Liganden in der Lösung übertragen. In einem zweiten Experiment wird bei einer Frequenz eingestrahlt, die weit von jeglichem Signal entfernt liegt. Hieraus resultiert ein normales NMR-Spektrum der Mischung. Aus den zwei Experimenten lässt sich ein Differenzspektrum gewinnen, welches nur Informationen über Protonen enthält, welche durch den Sättigungstransfer abgeschwächt wurden. Normalerweise sollte der Ligand auch alleine gemessen werden, da in diesem Fall auch Signale in dem Differenzspektrum beobachtet werden können. Dies kann z.B. durch Aggregationseffekte erklärt werden. Aus STD NMR Experimenten lassen sich ebenfalls Aussagen über Dissoziantionskonstanten gewinnen. Der Vorteil der Methode liegt in der schnellen Durchführbarkeit, da nur ein 1D-Spektrum benötigt wird um festzustellen, ob eine Wechselwirkung vorliegt. Allerdings lassen sich im Vergleich zu den tr-CCR Experimenten nicht so weitgehende Strukturinformationen gewinnen. Falls Informationen über den K_d -Wert und den k_{off} -Wert vorliegen, lässt sich das optimale Ligand/Proteinverhältnis berechnen. Andernfalls lassen sie sich über die Variation der Bedingungen ermitteln.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Peptidsynthesen

In der Doktorarbeit sind die folgenden zwei Strategien verfolgt worden. Beim Eindringen des HIV in eine Wirtszelle läuft eine Kaskade ab, nämlich die Bindung von CD4 an das gp120, die Freilegung von Epitopen im gp120, welche die Bindung an CCR5 erlauben und dadurch ausgelöst die Bindung an CCR5. Diese Kaskade könnte unterbrochen werden, indem etwa CCR5-Mimetika die CD4-induzierte Bindungsstelle von gp120 an CCR5 blockieren. Solche Mimetika haben unsere Kooperationspartner im Georg-Speyer-Haus auf zwei Arten versucht zu entdecken. Die Methoden beruhen auf dem *phage display*-Verfahren [126, 127] und sind in verkürzter Form in Abb. 4.1 dargestellt. Durch das Screening der CD4i-Epitope wurden Phagen identifiziert, die selektiv an gp120/CD4 banden. Die Peptidsequenzen auf den Phagen (Phagotope) sollten dann mit Sequenzen auf dem CCR5 übereinstimmen, die einigermaßen zugänglich sind. Solche zugänglichen Reste wurden dadurch gefunden, dass *phage-display Screening* gegen anti-CCR5-Antikörper durchgeführt wurde. Die Phagotope aus den beiden Screens sollten gemeinsame Peptidsequenzen enthalten, die einmal an das durch CD4 freigelegte gp120 Epitop binden, andererseits freiliegende Reste aus CCR5 enthalten. Der Schwerpunkt des Projektes liegt auf dem Screening der CD4i-Epitope (s. **A**, Abb. 4.1). Das Screening der anti-CCR5 mAbs (s. **B**, Abb. 4.1) wurde in einem vorherigen Projektabschnitt durchgeführt [128, 129],

allerdings wurden im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden Phagotope 3A9, 5C7 nachsynthetisiert.

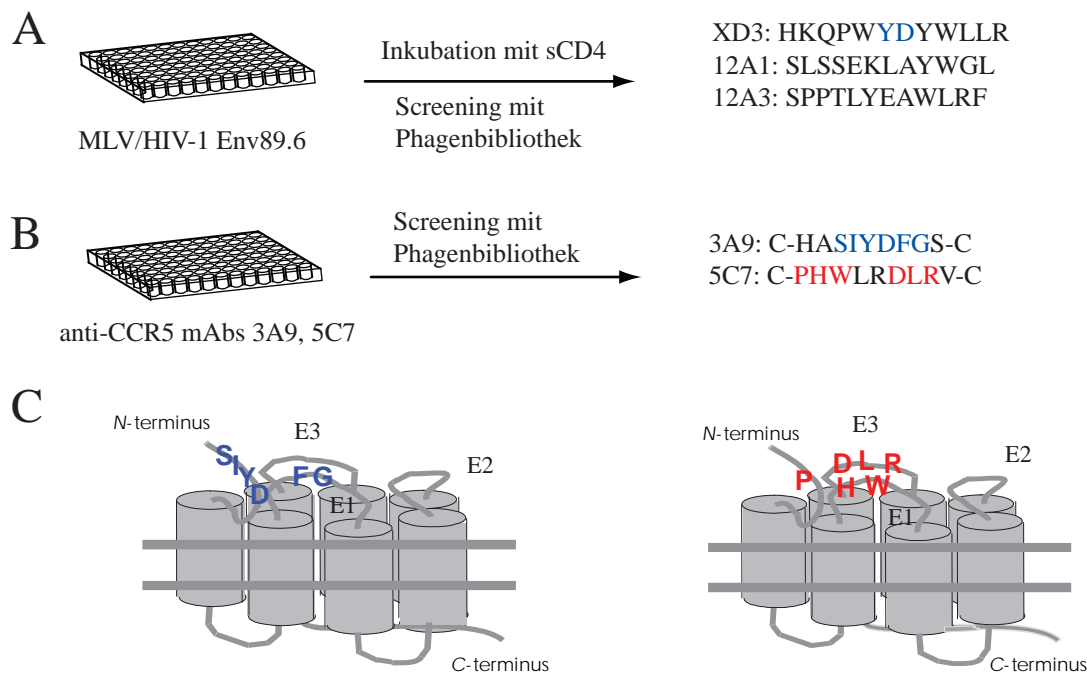


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der biologischen Assays, **A** Immobilisierung von MLV Partikeln, welche gp120 exprimieren, Inkubation mit sCD4 und Screening mit Phagenbibliotheken, **B** Immobilisierung von anti-CCR5 mAbs, Screening mit Phagenbibliotheken, **C** Zuordnung der Aminosäuren aus den Phagotopen zur CCR5 Sequenz, E1,E2,E3 kennzeichnen die drei extrazellulären Loops [130]

Tabelle 4.1: Übersicht synthetisierter Peptidliganden CD4i-Epitope

XD3	H K Q P W Y D Y W L L R
XD3 Biotin	Biotin-S G S G H K Q P W Y D Y W L L R
12A1	S L S S E K L A Y W G L
12A2	Biotin-S G S G V S T I P W K L G P G R

Hierbei galt ein besonderes Interesse der Tyrosin-O-Sulfatierung des 3A9 Peptides, da dies in bisherigen Studien nicht untersucht wurde. Die Optimierung der Synthese wird in Abschnitt 4.2.6 beschrieben. Es wurden zunächst verschiedene Phagotope

aus dem *phage display Screening* der CD4i-Epitope (s. A, Abb. 4.1) nachsynthetisiert und im Georg-Speyer-Haus von unserem Kooperationspartner auf ihre Inhibitionsseigenschaften untersucht. In Tab. 4.1 wird ein Überblick über die zuerst synthetisierten Peptidliganden für die CD4i-Epitope gegeben. Die Peptidsynthesen erfolgten entweder manuell oder über den Peptidsynthesizer 433A von Applied Biosystems. Die Biotinylierung erfolgte nach dem zusätzlichen Einbau eines S G S G-Spacers am *N*-terminus. Die biotinylierten Peptide wurden im Georg-Speyer-Haus für *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISAs) verwendet, während mit den nichtbiotinylierten Peptiden zellbasierte Studien durchgeführt wurden. Besonders interessant ist hierbei die XD3-Sequenz, da es einige Homologien zu den Aminosäuren des CCR5-*N*-terminus gibt (s. Abb. 4.2). Besonders das YD-Motiv wurde in verschiedenen Mutationsstudien als sehr wichtig für den HIV-Eintritt identifiziert [54, 55, 56, 57]. Eine Mutation einer der beiden Aminosäuren im CCR5 reduziert den HIV-Eintritt um 90% und auch die direkte Bindung an gp120 wird stark abgeschwächt. Weiterhin findet sich das YD-Motiv in verschiedenen CD4i Antikörpern (s. 4.2). Eine Untersuchung des synthetisierten Peptides von unserem Kooperationspartner im Georg-Speyer-Haus ergab jedoch eine deutlich geringere Aktivität als man aufgrund des *phage display Screenings* erwartet hatte. Im CCR5-Rezeptor liegen die Tyrosinreste sulfatiert vor (s. 1.2.1). Durch die Modifizierung von Tyrosin als Tyrosin-*O*-Sulfat sollte sich die biologische Aktivität der Peptide deutlich erhöhen lassen.

XD3	HKQ	PWYDYWLLR
12A1	S	PPTLYEAWLRF
3A9/5C7 sum	S-IYD	HWFG-DLR
CCR5	VSSP I	YDINYYT
E51 CD3	GDYAD	YDGGYYY

Abbildung 4.2: Homologien Peptidliganden / CCR5-*N*-terminus / CD4i mAb, 3A9/5C7 sum entspricht dem gemeinsamen Epitop 3A9, 5C7- Peptid, E51 ist ein CD4i mAb, dessen CD3 Region Tyrosin *O*-sulfatiert vorliegt [60]

4.2 Synthese Tyrosin *O*-sulfatierter Peptide

4.2.1 Einbau von Tyrosin *O*-Sulfat

Für die Synthese der Tyrosin *O*-sulfatierten Peptide wurden zunächst sowohl der Einbau des fertigen Fmoc-Tyr(SO₃)-OH Bausteins als auch die nachträgliche Sulfatierung des fertigen Peptides getestet. Der Fmoc-Tyr(SO₃Na)-OH Baustein wurde nach der Vorschrift von Yagami synthetisiert [108]. In der Literatur wurde berichtet, dass die Kupplungen mit den synthetisierten Fmoc-Tyr(SO₃) Bausteinen etwas unzuverlässig funktionieren. Es wurden deshalb die DIC/HOBt- und die HBTU/HOBt-Aktivierung getestet.

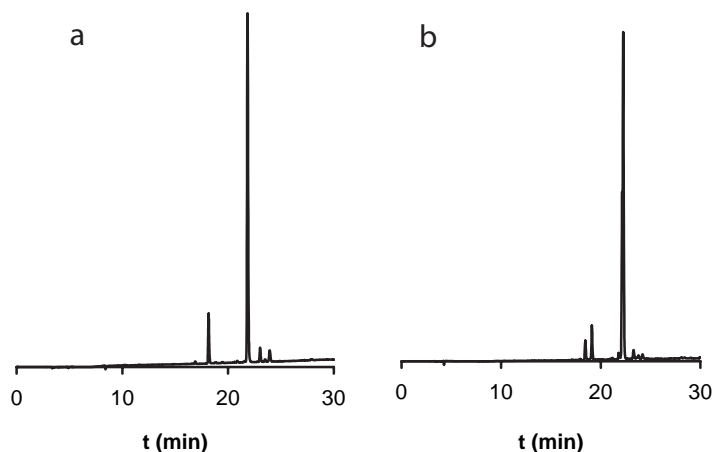


Abbildung 4.3: Vergleich DIC/HBTU-Aktivierung von Fmoc-Tyr(SO₃)-OH a) DIC/HOBt-Aktivierung, b) HBTU/DIEA-Aktivierung, Peptid 12A1, Kupplungsschritt WGL \rightarrow Y(SO₃)WGL

4.2.2 Sulfatierung des geschützten Peptides

Für die nachträgliche Sulfatierung wurde das XD3-Peptid ohne Seitenkettenschutzgruppen an den Tyrosinresten synthetisiert. Anschließend wurde das Peptid am Harz mit einem DMF-SO₃-Komplex sulfatiert. Die Abspaltung wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei dem Einbau des Fmoc-Tyr(SO₃)-Bausteins durchgeführt. In den HPLC-Chromatogrammen ist kein Unterschied zwischen der DIC/HOBt-Aktivierung und der HBTU/HOBt-Aktivierung zu erkennen.

4.2.3 Synthese Tyrosin O-Sulfatierter Peptide für die CD4i-Epitope

Es wurden folgende Tyrosin O-sulfatierten Varianten der Peptide synthetisiert:

[Y(SO ₃) ⁸] XD3	HKQPWYDY(SO ₃)WLLR
[Y(SO ₃) ⁶] XD3	HKQPWY(SO ₃)DYWLLR
[Y(SO ₃) ⁶ , Y(SO ₃) ⁶] XD3	HKQPWY(SO ₃)DY(SO ₃)WLLR
[Y(SO ₃) ⁸] XD3 Biotin	Biotin-SGSGHKQPWYDY(SO ₃)WLLR
[Y(SO ₃) ⁶] XD3 Biotin	Biotin-SGSGHKQPWY(SO ₃)DYWLLR
[Y(SO ₃) ⁶ , Y(SO ₃) ⁶] XD3 Biotin	*Biotin-SGSGHKQPWY(SO ₃)DY(SO ₃)WLLR
[Y(SO ₃) ⁹] 12A1	SLSSEKLAY(SO ₃)WGL
[Y(SO ₃) ⁹] 12A1 Biotin	Biotin-SGGGSLSSEKLAY(SO ₃)WGL
[Y(SO ₃) ⁶] 12A3	SPPTLY(SO ₃)EAWLRF

Die Biotinylierung erfolgte ebenfalls mit einem S G S G-Spacer am *N*-terminus. Die unterschiedlichen sulfatierten Peptide zeigten jedoch entgegen der Erwartungen keine wesentlich verbesserten Ergebnisse in den biologischen Tests. Allerdings konnten Cormier et al. in ihren Untersuchungen auch keine Bindung über ELISAs nachweisen [59]. Dies ist ein potenzielles Problem bei der Durchführung von biologischen Untersuchungen, die eine Vielzahl von Waschschritten erfordern. Wenn der Ligand nur eine sehr geringe Affinität im hohen mikromolaren Bereich aufweist, besteht die Gefahr, dass der Ligand in den Waschschritten entfernt wird [†]. Gerade in diesen Fällen ist die NMR-Spektroskopie ein wichtiges Hilfsmittel, um schwache Wechselwirkungen zu untersuchen. Für die Messung der $\Gamma^{N,NH}$ -Rate muss ein ¹⁵N-markierter Baustein in der Sequenz vorliegen. Aus diesem Grund wurde am *N*-terminus ein acetylierter, ¹⁵N, ¹³C-markierter Glycinrest eingebaut.



* Die Synthese dieses Peptides war nicht erfolgreich. Aufgrund der negativen Ergebnisse mit den anderen Peptiden wurde auf eine Nachsynthese verzichtet.

[†] Anmerkung: Die Biotinylierung ist für die Detektion der gebundenen Peptide erforderlich und nicht zur Immobilisierung

4.2.4 Synthese CCR5-N-terminaler Peptide

Für das CCR5- *N*-terminale Referenzpeptid wurden verschiedene Sequenzen in der Literatur beschrieben. Cormier et al. benutzten für ihre Untersuchungen ein dreifach Tyrosin *O*-sulfatiertes Peptid, welches den Aminosäuren 2-18 des *N*-terminus entspricht [59]. Farzan et al. verwendeten eine etwas längere Sequenz, welche den Aminosäuren 1-22 entspricht und Cys20 gegen Serin ersetzt wird [58]. In Abb. 4.4 sind die verschiedenen Versionen des CCR5-Nt-Peptides aufgeführt. Außerdem gibt

Sequenz	Name / Referenz
$\begin{array}{cccccccccccccccccccc} \text{D} & \text{Y} & \text{Q} & \text{V} & \text{S} & \text{S} & \text{P} & \text{I} & \text{Y} & \text{D} & \text{I} & \text{N} & \text{Y} & \text{Y} & \text{T} & \text{S} & \text{E} \\ & & & & & & & & & & & & & & & & \\ \text{SO}_3 & & & & & & & & & \text{SO}_3 & & & & & \text{SO}_3 & & \end{array}$	CCR5 2-18 / Cormier
$\begin{array}{ccccccccccccccccccccccccc} \text{D} & \text{Y} & \text{Q} & \text{V} & \text{S} & \text{S} & \text{P} & \text{I} & \text{Y} & \text{D} & \text{I} & \text{N} & \text{Y} & \text{Y} & \text{T} & \text{S} & \text{E} & \text{G} & \text{A} & \text{G} & \text{K} & \text{-NH}_2 \\ & \\ \text{SO}_3 & & & & & & & & & \text{SO}_3 & & & & & \text{SO}_3 & & & & & & \text{Biotin} & \end{array}$	CCR5 2-22 Biotin / Cormier
$\begin{array}{cccccccccccccccccccc} \text{D} & \text{Y} & \text{Q} & \text{V} & \text{S} & \text{S} & \text{P} & \text{I} & \text{Y} & \text{D} & \text{I} & \text{N} & \text{Y} & \text{Y} & \text{T} & \text{S} & \text{E} & \text{G} \\ & & & & & & & & & & & & & & & & \\ \text{SO}_3 & & & & & & & & & \text{SO}_3 & & & & & \text{SO}_3 & & \end{array}$	CCR5 2-18 ¹⁵ N Gly

Abbildung 4.4: Vergleich CCR5-Nt-Peptide

es in den Publikationen von Farzan [58] und Cormier einige unterschiedliche Beobachtungen. Cormier et al. haben in ihren Biacore Experimenten keine Bindung ihrer sulfatierten Peptide an gp120 in Abwesenheit von CD4 gefunden. Weiterhin haben sie festgestellt, dass die Affinität der Peptide bei der Verwendung von löslichem CD4 nur äußerst gering ist, weshalb sie CD4-Ig2 verwendet haben. Farzan et al. haben Experimente mit anti-gp120 mAb durchgeführt um die Bindungsstelle ihres sulfatierten Peptides zu ermitteln. Hierbei stellten sie fest, dass ihr sulfatiertes Peptid die Präzipitation von gp120 durch den 48d mAb inhibiert. Interessanterweise trat dieser Effekt in abgeschwächter Form auch in Abwesenheit von CD4 auf. Außerdem zeigte das Peptid bei dem 17b Antikörper keine Inhibition. In beiden Arbeiten werden auch unterschiedliche Virusisolate verwendet. Cormier stellt in HIV Entry Inhibitionsstudien nur eine Wirkung bei dem R5 strain HIV-1 JRFL fest. Bei den R5X4 Strains HIV-1 DH123 und HIV-1 Gun-1 stellt er keine Inhibition fest. Farzan sieht eine HIV Entry Inhibition mit dem R5 Strain ADA und dem R5X4 Strain

89.6. Es ist nur schwer nachvollziehbar, warum das sulfatierte Peptid bei Farzan bei R5X4 Strains Wirkung zeigt, während es im Fall von Cormier keine Inhibition bei R5X4 Strains auftritt. Die abweichenden Erkenntnisse in den Arbeiten zeigen, dass es noch weiterhin Erklärungsbedarf zur Funktion der CCR5 N-terminalen Peptide gibt. Zunächst wurde für die Untersuchung die von Cormier beschriebene Sequenz 2-18 verwendet, um die Synthese möglichst kurz zu halten. Die Biotinylierung erfolgte in diesem Fall am C-terminus durch einen Lysinrest mit biotinylierter Seitenkette.

4.2.5 Optimierung der Abspaltungsbedingungen Tyrosin-O-sulfatierter Peptide

Die Abspaltung wurde bei 0°C durchgeführt, um die Abspaltung des Sulfatrestes zu unterdrücken. Dies ist von entscheidender Bedeutung, wie man anhand der Abspal-

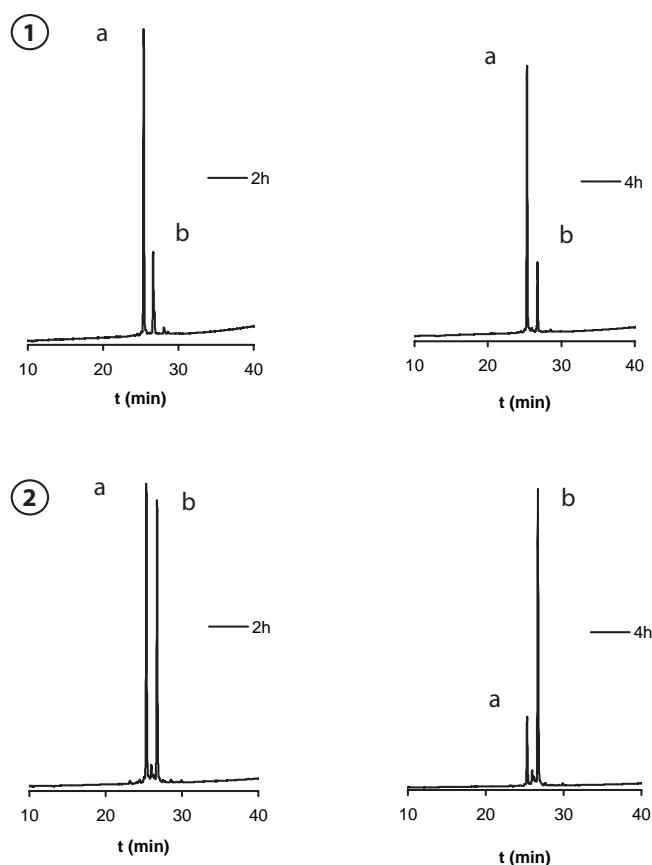


Abbildung 4.5: Temperaturabhängigkeit der Desulfatierung

1) Abspaltung bei 0°C, 2) Abspaltung bei Raumtemperatur, **a** INY(SO₃)YTSEPSQK, **b** IN-YYTSEPSQK, Abspaltlösung TFA/H₂O/*m*-Kresol (90/5/5)

tungsversuche mit einem CCR5-Nt-Peptid in Abb.4.5 erkennt. Eine weitere Verringerung der Temperatur ist nicht vorteilhaft, da im HPLC Chromatogramm viele Nebenpeaks für teilweise geschützte Peptide auftreten (s. Abb. 4.6). In diesem Fall ist die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen zu sehr verlangsamt. Die Opti-

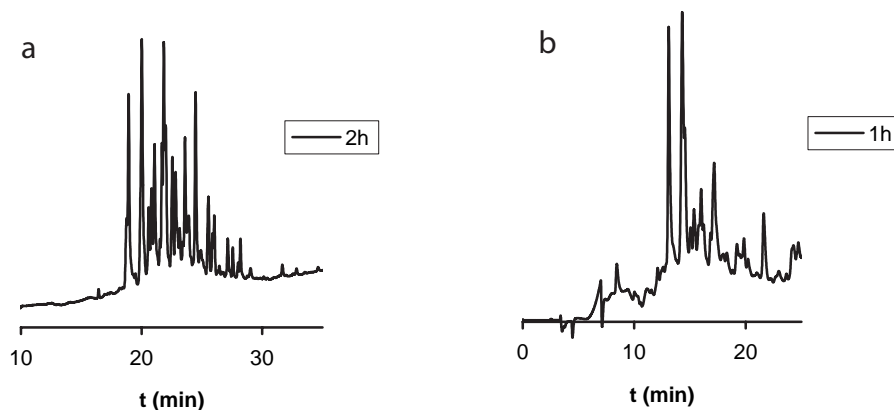


Abbildung 4.6: Abspaltungsversuche CCR5, a) 2h bei -15°C , b) 1h bei 0°C , Abspaltlösung TFA/ H_2O /*m*-Kresol (90/5/5)

mierung der Abspaltungszeit ist ein sehr wichtiger Punkt für sulfatierte Peptide, da eine unnötig verlängerte Abspaltungszeit einen größeren Verlust an Sulfatierung bedeutet. Ein Vergleich zwischen 2h und 5h Abspaltungszeit für das CCR 1-18 Peptid zeigt, dass eine Reaktionszeit von 2h Stunden ausreichend ist, da bereits alle Seitenkettenschutzgruppen entfernt sind (s. Abb. 4.7). Eine Verlängerung auf 5h verstärkt nur die Desulfatierung. Andererseits zeigt eine Abspaltung für 1h viele partiell geschützte Peptide im HPLC Chromatogramm, so dass eine Reaktionszeit von 2h das Optimum für dieses spezielle Peptid darstellt (s. Abb. 4.6). Weiterhin wurde der Einfluß unterschiedlicher Abfangreagenzien auf die Desulfatierung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl EDT als auch TIS eine verstärkte Abspaltung des Sulfatrestes zur Folge haben (s. Abb. 4.7). Die besten Ergebnisse wurden mit 5% *m*-Kresol, 5% H_2O , 90% TFA erzielt, welches den Bedingungen von Yagami et al. entspricht [108]. Die Abspaltungszeit mußte für das XD3 Peptid ebenfalls verlängert werden, da die niedrige Temperatur die Entfernung der Pmc Schutzgruppe vom Argininrest ebenfalls verlangsamt. In Abb. 4.8 ist die Optimierung der Abspaltungszeit am Beispiel des XD3 Peptides gezeigt. Als Abspaltlösung wurde 5% *m*-Kresol, 5% H_2O , 90% TFA verwendet. Bei einer zu kurz gewählten Reaktionszeit entspricht das Hauptprodukt dem XD3 Peptid mit Pmc Schutzgruppe. Eine sehr lange Reaktions-

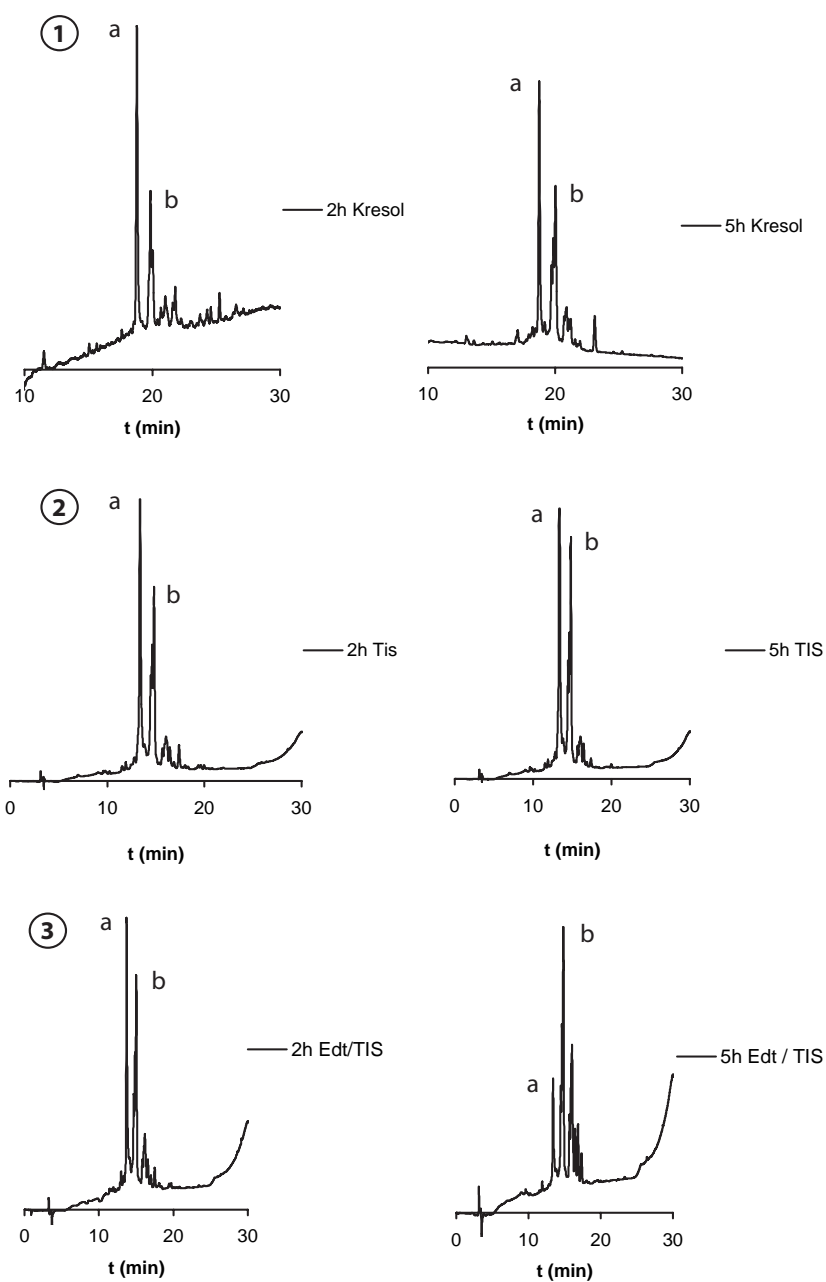


Abbildung 4.7: Optimierung der Abspaltungsbedingungen für $DY(SO_3 QVSSPIY(SO_3)DINY(SO_3)YTSE$

1) TFA/ H_2O /m-Kresol (90/5/5), 2) TFA/ H_2O /Tis (90/5/5), 3) TFA/TIS/EDT/ H_2O (87.5/2.5/5/5), a: CCR5 Peptid, b: CCR5 - SO_3

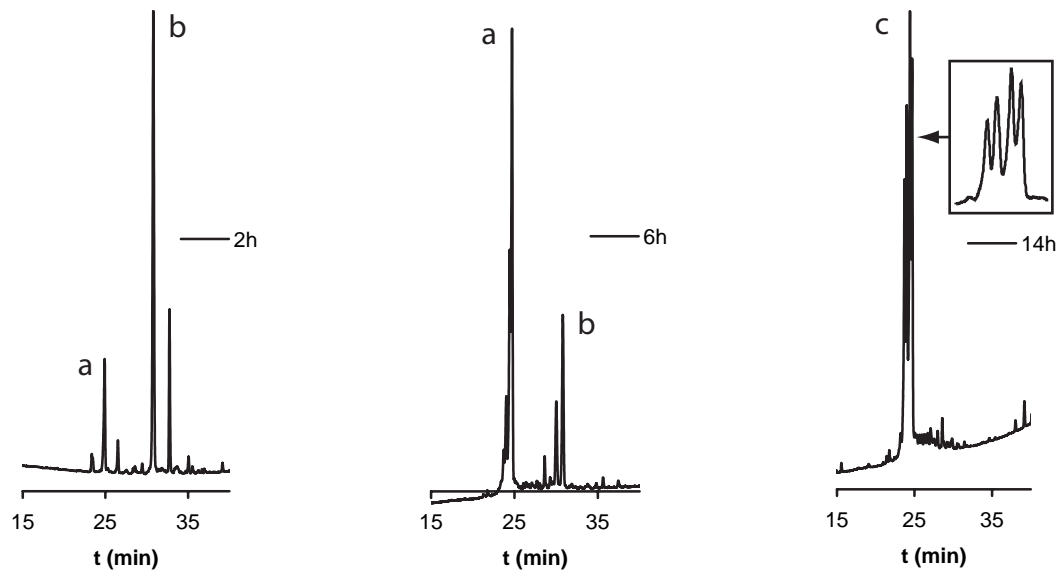


Abbildung 4.8: Optimierung der Abspaltungszeit für HKQPWYDY(SO₃)WLLR

Abspaltungslösung TFA/H₂O/*m*-Kresol (90/5/5) bei 0° C, 2h: Hauptpeak **b** entspricht XD3 + Pmc Schutzgruppe, 14h: kein Peak für XD3 + Pmc Schutzgruppe, 6h: Hauptpeak **a** XD3 Peptid

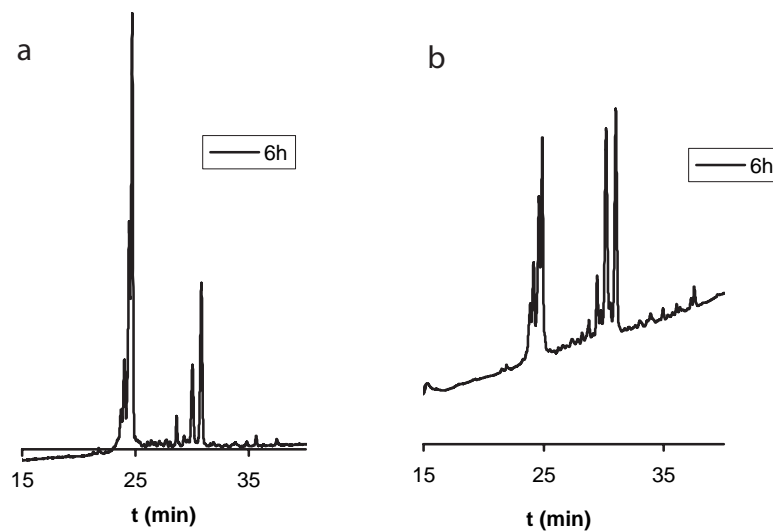


Abbildung 4.9: Vergleich Abspaltung XD3, a) 6h bei 0° C, TFA/H₂O/*m*-Kresol (90/5/5), b) 6h bei 0° C, TFA/H₂O (95/5) die Abspaltung mit *m*-Kresol **a** zeigt deutlich weniger Nebenprodukte

zeit entfernt zwar die Pmc Schutzgruppe vollständig, führt aber zu einer Zersetzung des Peptides. Bei einer Abspaltungszeit von 6h erhält man das gewünschte Peptid als Hauptkomponente. In der Literatur wird am Beispiel von einem CCK Peptid beschrieben, dass die alleinige Verwendung von H₂O / TFA die besten Abspaltungs-

resultate liefert. Dies ist für das XD3 Peptid nicht der Fall. Ein Verzicht auf das *m*-Kresol führt zu einer deutlich größeren Anzahl an Nebenpeaks (s. Abb. 4.8).

4.2.6 Syntheseoptimierung des 3A9 und 5C7 Peptides

In dieser Arbeit wurden einige Peptidsequenzen aus einem *phage display screening* der anti-CCR5 mAbs 3A9 bzw. 5C7 nachsynthetisiert. Die entsprechenden Sequenzen sind über jeweils ein *N*-terminales bzw. *C*-terminales Cystein cyclisiert. In Abb. 4.10 ist eine Zusammenstellung der synthetisierten Peptide aufgeführt. Die Affi-

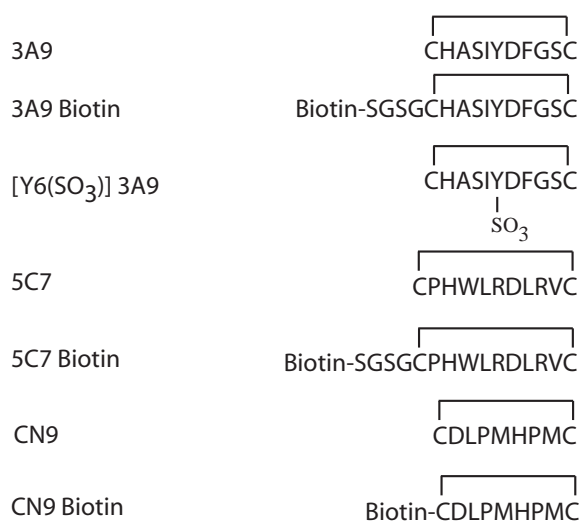


Abbildung 4.10: Übersicht synthetisierter Peptide aus anti-CCR5 mAbs screening

nität des 3A9- und 5C7-Peptides wurden bereits in einem vorhergehenden Projektabschnitt gezeigt. Ein Hauptinteresse bei dieser erneuten Synthese galt dem Einfluß der Sulfatierung des Tyrosin im 3A9 Peptid. Die nichtsulfatierten Varianten des 3A9-Peptides und auch des 5C7-Peptides wurden als Kontrollpeptide synthetisiert. Anderen Sequenzen wie das CN9 stammen ebenfalls aus dem *phage display screening*, wurden allerdings zu Syntheseoptimierungen verwendet. Es wurden verschiedene Methoden zur Ausbildung der Disulfidbrücke getestet. Der Reaktionsverlauf wurde durch HPLC-MS oder durch den Ellman Test, einer Farbreaktion für freie Sulfhydrylgruppen, verfolgt.

1. Oxidation mittels Luftsauerstoff [131]

Das 3A9 Peptid wurde in 0.1 M NH₄HCO₃ Puffer gelöst (1mg/ml) und für

14-38h gerührt. Anschließend wurde das Peptid mittels HPLC-MS untersucht. Das Reaktionsende wurde durch die $[M-2H]$ Produktmasse der oxidierten Form angezeigt.

2. Oxidation mittels DMSO [132]

Das Peptid wurde in 5% Essigsäure gelöst (1mg/ml) und der pH-Wert auf pH = 6 mit NH_4HCO_3 Lsg. eingestellt. Es wurde DMSO hinzugegeben (20%) und 12h gerührt. Der Abschluß der Oxidation wurde durch HPLC-MS kontrolliert.

3. Oxidation mittels Thallium [133]

Es wurde eine Oxidationslösung aus TFA/ CH_2Cl_2 /Anisol und 1.2eq Tl(III)-trifluoracetat angesetzt und auf 0°C gekühlt. Das lyophilisierte Peptid wurde mit der vorgekühlten Oxidationslösung versetzt (4mg/ml) und für 5h geschüttelt. Der Abschluß der Oxidation wurde durch HPLC-MS kontrolliert.

Die Oxidation mittels Luftsauerstoff ließ sich erfolgreich durchführen (s. Abb. 4.11, Nr.3). Bei größeren Reaktionsansätzen erhielt man allerdings viel unlösliches Präzipitat.

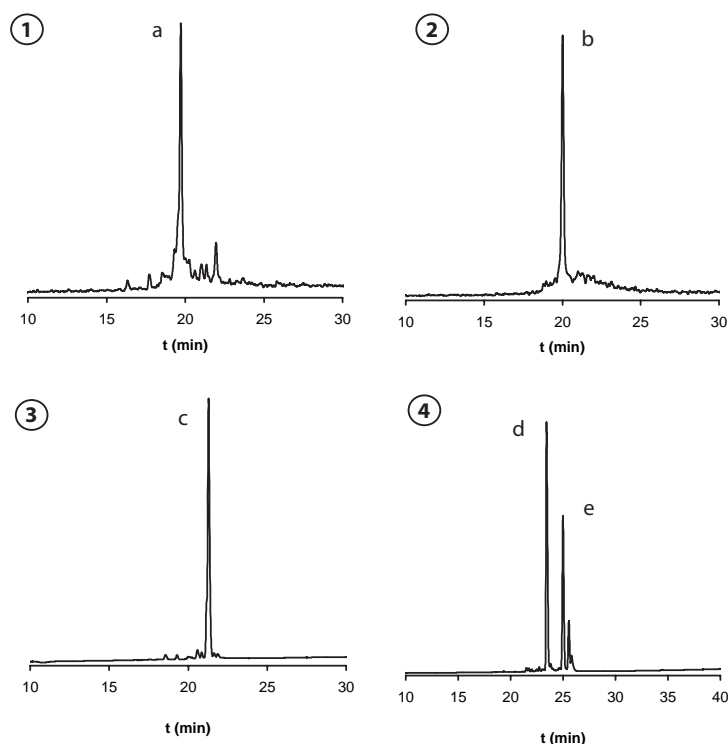


Abbildung 4.11: Oxidationsversuche, 1) nichtoxidiertes 3A9 Biotin, **a** lineares Peptid, 2) Oxidation 3A9 Biotin mittels DMSO, **b** cyclisches Peptid 3) Luftoxidation CN9As, **c** cyclisches Peptid 4) Luftoxidation CN9As Biotin, **d** lineares Peptid, **e** cyclisches Peptid

Ein weiterer Nachteil liegt in der langen Reaktionszeit. So zeigte die Oxidation des biotinylierten Peptides nach 12h immer noch einen großen Anteil nichtoxidierten Peptides (s. Abb. 4.11, Nr.4). Die Verwendung von DMSO als Oxidationsmittel zeigte sowohl für die biotinylierten (s. Abb. 4.11, Nr.2) als auch die nichtbiotinylierten Peptide zufriedenstellende Resultate. Das 3A9 und 5C7 Peptid wurden in biotinylierter und nichtbiotinylierter Form unter Verwendung von DMSO oxidiert. Die Oxidation der biotinylierten Peptide erforderte im Vergleich zu den nichtbiotinylierten Peptiden eine deutlich längere Reaktionszeit. Da das YD Motiv im CCR5-Rezeptor sulfatiert vorliegt, (s. 1.2.1) ist zu erwarten, dass die Sulfatierung des YD-Motivs im 3A9 Mimotop eine Affinitätsänderung bewirkt. Für die Synthese des cyclischen,

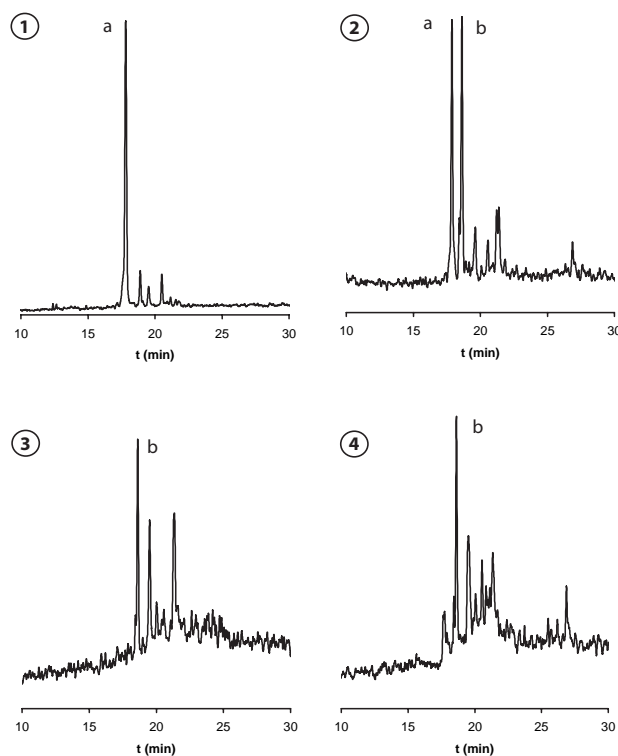


Abbildung 4.12: Oxidationsversuche sulfatiertes 3A9 Peptid, **a** lineares $[Y(SO_3)^6]$ 3A9, **b** cyclisches $[Y(SO_3)^6]$ 3A9 1) nichtoxidiertes $[Y(SO_3)^6]$ 3A9 , 2) Oxidation $[Y(SO_3)^6]$ 3A9 mit DMSO, 3) Abspaltung $[Y(SO_3)^6]$ 3A9 vom Harz und Oxidation mit $Tl(III)$, 4) Oxidation $[Y(SO_3)^6]$ 3A9 in Lösung mittels $Tl(III)$

sulfatierten 3A9 Peptides musste der Oxidationsschritt nochmals optimiert werden. Die Oxidation mittels DMSO zeigte auch nach einer Reaktionszeit von 8h noch lineares Peptid (s. Abb. 4.12, Nr.2) Als weiteres Verfahren wurde die Oxidation mittels Thallium(III) untersucht [133]. Ein Nachteil dieses Verfahrens liegt in den

stark sauren Oxidationsbedingungen, welche zu einer Zersetzung des sulfatierten Tyrosinrestes führen. Um die Abspaltung der Sulfatgruppe so gering wie möglich zu halten, wurde die Oxidation bei 0°C durchgeführt. Zunächst wurde versucht, die Abspaltung des Peptides vom Harz und die Oxidation in einem Schritt durchzuführen. Obwohl sich die Reaktion erfolgreich ausführen ließ, trat bei dieser Methode eine große Anzahl an Nebenprodukten auf (s. Abb. 4.12, Nr.3). Das beste Resultat wurde durch Oxidation des lyophilisierten Rohpeptides in TFA/CH₂Cl₂/Anisol mittels Thallium(III) erzielt (s. Abb. 4.12 Nr. 4). Allerdings war die Gesamtausbeute an aufgereinigtem Peptid gering, zumal die stark sauren Oxidationsbedingungen zu einer gewissen Zersetzung des Peptides führten. Da sich in den biologischen Assays im Georg-Speyer-Haus herausgestellt hat, dass die Einführung der Sulfatgruppe keine Verbesserung der Inhibitionseigenschaften hervorruft [130], wurde auf eine weitere Optimierung der Cyclisierung verzichtet.

4.3 NMR-Experimente

4.3.1 Kontrolle der Proteine

Wie in der Einleitung erwähnt, gibt es eine enorm große Zahl an verschiedenen HIV-1 Subtypen und ENV Formen, die sich teilweise sehr stark in ihrer Sequenz unterscheiden. Eine Untersuchung kann deshalb meistens nur eine geringe Zahl verschiedener ENV Typen berücksichtigen. Für die NMR-Untersuchungen wurde HIV-1 JRFL [134] verwendet, welches von dem Merck Research Laboratory, Rahway NJ 07065 zur Verfügung gestellt wurde. JRFL ist ein primäres HIV-1 Subtyp B Isolat, welches zum R5 Phenotyp gehört. Es ist ein sehr typischer Vertreter des R5-Phenotypes und wird sehr häufig verwendet. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass unser Kooperationspartner ebenfalls mit JRFL arbeitet und damit eine direkte Vergleichbarkeit zwischen unseren NMR-Messungen und den biologischen Assays besteht. Um die Qualität des verwendeten gp120 zu überprüfen, wurde eine SDS-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Abb. 4.13 zeigt, dass das Protein homogen ist und auch im erwarteten Molmassenbereich im Gel zu sehen ist. Zusätzlich wurde ein Aliquot des Proteins an das Georg-Speyer-Haus gesendet, wo die biologische Aktivität des Pro-

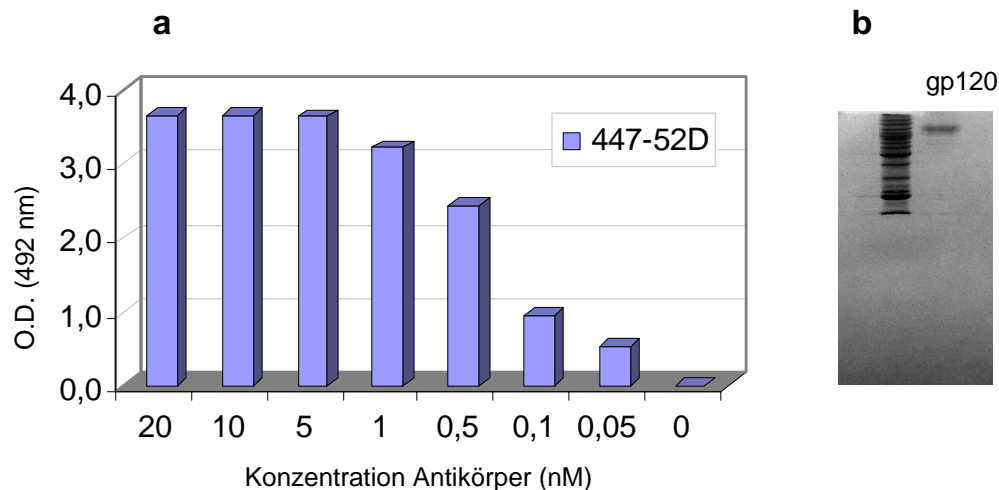


Abbildung 4.13: Biologische Aktivität/Homogenität von gp120, vorbeschichtetes gp120 JRFL, **a** der 447-52D Antikörper bindet wie erwartet mit einer nanomolaren Affinität an das Protein (Abb. von Xavier Derville, Georg-Speyer-Haus)

b SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli [135], Die Zusammensetzung von dem Sammelgel und Trenngel befinden sich in D

teins weiter kontrolliert wurde. Die Abb. 4.14 zeigt das Ergebnis der Bindungsstudien mit dem 447-52D mAB. Der 447.52D mAb ist ein anti-gp120-Antikörper, der das GPGR-Motiv vom V3-Loop des gp120 erkennt [136]. Auch das für unsere NMR-Experimente verwendete sCD4 von der Firma RD Systems wurde im Georg-Speyer-Haus auf seine Funktionalität überprüft. Die Kontrolle erfolgte in diesem Fall mit dem CD4-induzierten mAbs 17b und GC10 [78]. Als Kontrolle diente sCD4, welches von unserem Kooperationspartner im Georg-Speyer-Haus verwendet wird. Eine grundsätzliche Frage stellt sich in der Verwendung des Puffersystems. Um eine gute Vergleichbarkeit mit anderen biologischen Assays zu gewährleisten sollten die Messungen unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Die Verwendung eines Phosphatpuffers für die NMR-Spektroskopie ist deshalb so vorteilhaft, da man keine zusätzlichen Signale in seinem Spektrum bekommt. Da bei den Peptiden ein wesentliches Merkmal die Wechselwirkung der Sulfatgruppe darstellt, kann ein Phosphatpuffer eventuell zu Problemen führen. In der Literatur gibt es zwar NMR Studien von sulfatierten Peptiden [137, 138, 139]. Hierbei wurden die Struktur aber direkt in Wasser bestimmt. Andere Arbeitsgruppen verwenden z.B. MOPS Puffer für ihre Assays. Eine Optimierung des Puffers ist schwierig, da das Protein im NMR

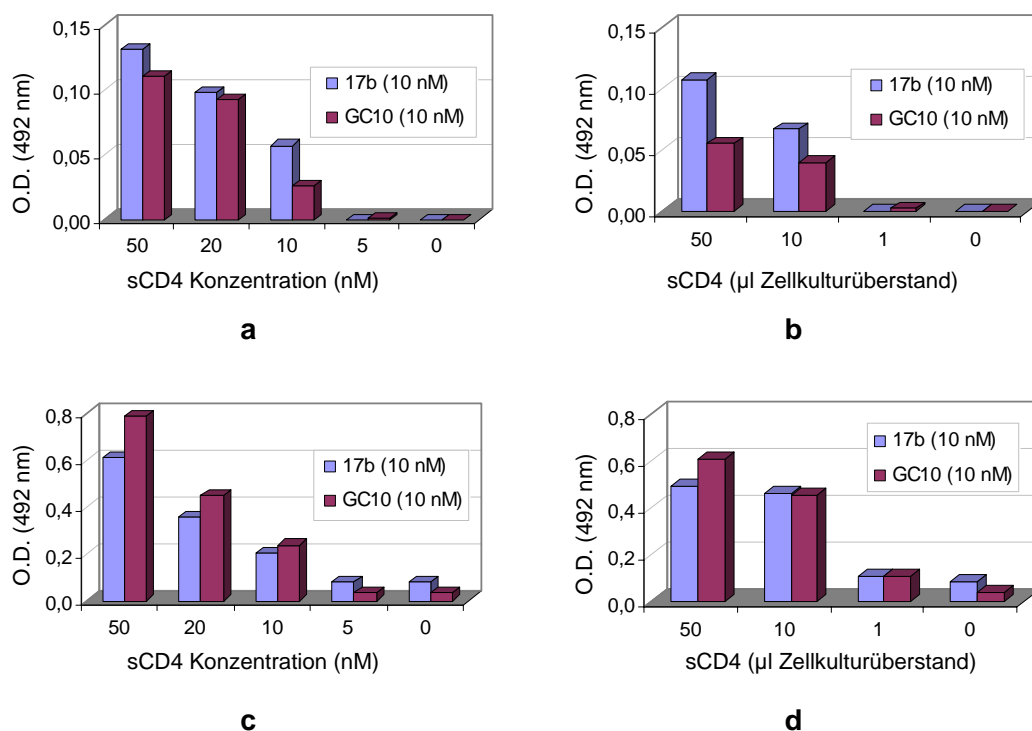


Abbildung 4.14: Biologische Aktivität sCD4

a) vorbeschichtetes gp120 und sCD4 von der Fa. RD Systems, b) Kontrollexperiment mit vorbeschichtetem gp120 und sCD4 aus dem Georg-Speyer-Haus, c) vorbeschichtete gp120 MLV Partikel und sCD4 von RD Systems, d) Kontrollexperiment mit vorbeschichteten gp120 MLV Partikeln und sCD4 aus dem Georg-Speyer-Haus,

Aus a) und c) ist ersichtlich, dass die Antikörper wie erwartet eine sCD4 abhängige Bindung zeigen, die Bindung ist hierbei vergleichbar oder teilweise noch stärker als in den Kontrollexperimenten b) und d)

nicht sichtbar ist und man nach Vorbereitung der NMR Probe keine Rückmeldung über den Zustand des Proteins bekommt.

4.3.2 tr-CCR Experimente

Zunächst wurde die Pulssequenz für die Messung der CCR-Raten an einer ^{15}N gelabelten Ubiquitin Probe getestet. Hierbei ergibt sich eine Rate von 6 Hz, welche gut mit den Literaturwerten übereinstimmt [140]. Anschließend wurde die Pulssequenz für die Bindungsstudien des modifizierten XD3 Peptides verwendet (s. S. 43). In Abb. 4.15 sind die gemessenen N,NH CCR-Raten für das freie XD3 Peptid,

XD3/gp120 und die XD3/gp120/sCD4 Mischungen dargestellt. Da in diesem Fall nur eine markierte Aminosäure in der Sequenz vorliegt, wird nur eine 1D Variante von dem 2D Experiment aufgenommen.

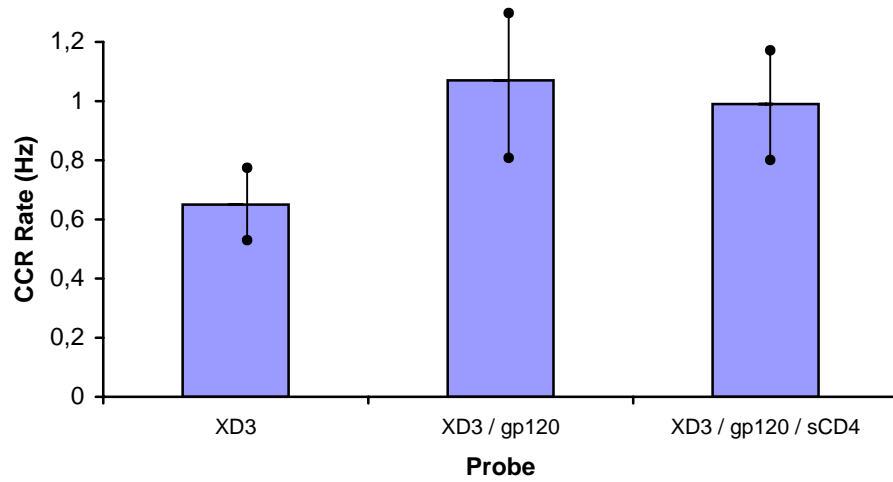


Abbildung 4.15: $\Gamma(N, NH)$ für das XD3 Peptid, Probe: 1 μM gp120, sCD4; 100 μM Peptide, 250 μl PBS Puffer pH 7, , der Fehler wurde über das Signal/Rauschverhältnis abgeschätzt

	XD3	XD3/gp120	XD3/sCD4/gp120
$\Gamma(N, NH)$	0,65 \pm 0,10	1,07 \pm 0,31	0,99 \pm 0,24
K_d^\ddagger		150 \pm 55 μM	238 \pm 71 μM

Tabelle 4.2: K_d Werte XD3

Für das freie Peptid erhält man eine Rate von 0,6 Hz. Dies entspricht den Erwartungen für ein 12mer Peptid mit einem Molekulargewicht von 1,7 kDa. Wie aus den Abbildungen zu entnehmen ist, nimmt die CCR-Rate zwar zu, allerdings erfolgt die Zunahme nicht in Abhängigkeit von CD4. Das deutet darauf hin, dass das Peptid nicht an die CD4i-Epitope bindet. Aus den gemessenen Raten lässt sich ein Bereich für den K_D Wert von 50 μM abschätzen. Weitere biologische Test aus dem Georg-Speyer-Haus haben bestätigt, dass die Bindung des Peptides nicht CD4 abhängig ist. In Abb. 4.16 sind die Raten für das CCR5 2-18 Referenzpeptid dargestellt. Auch in diesem Fall wurde das tr-CCR Experiment als 1D Variante gemessen. Die

[‡]Der angegebene Fehler bezieht sich auf die Messgenauigkeit der Raten. Durch Ungenauigkeiten in dem Peptid/Protein Verhältnis ist der Fehler noch größer

[‡]Der angegebene Fehler bezieht sich auf die Messgenauigkeit der Raten. Durch Ungenauigkeiten in dem Peptid/Protein Verhältnis ist der Fehler noch größer

gemessene Rate für das freie Peptid stimmt gut mit dem in der Literatur beschriebenen Hydrodynamischen Radius überein [141]. Entgegen der Erwartungen ist für das CCR5-Nt / sCD4 / gp120 nur ein geringer Anstieg der Rate zu erkennen.

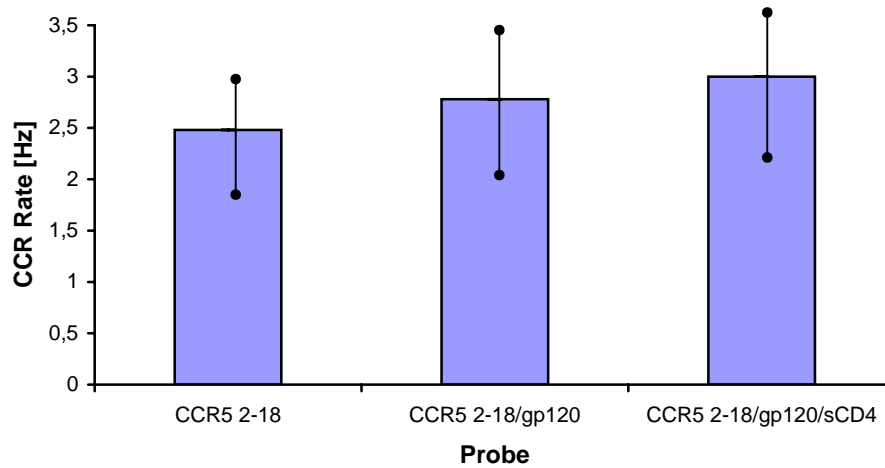


Abbildung 4.16: $\Gamma(N, NH)$ für das CCR5-Nt-Peptid, Probe: 1 μM gp120, sCD4; 100 μM Peptide, 250 μl PBS Puffer pH 7, der Fehler wurde über das Signal/Rauschverhältnis abgeschätzt

	CCR5 2-18	CCR5 2-18/gp120	CCR5 2-18/sCD4/gp120
$\Gamma(N, NH)$	2,48 ± 0,52	2,78 ± 0,7	3 ± 0,8
K_d^{\S}		267 ± 122 μM	205 ± 90 μM

Tabelle 4.3: K_d Werte CCR5 2-18, die großen Fehlerbereiche ergeben sich durch ein sehr niedriges Signal/Rauschverhältnis in den Cross-Spektren

Der ermittelte Wert liegt mit 3 Hz zwar höher als für das CCR5-Nt / gp120 Experiment. Allerdings ist das Molekulargewicht des gp120 im Komplex mit sCD4 um 40 kDa höher als für das freie gp120, so dass sich bei der Abschätzung der Dissoziationskonstanten ein vergleichbarer Wert ergibt. Da sich der Anstieg der Raten in einer vergleichbaren Größenordnung wie der Messfehler bei der Ermittlung der Raten befindet, sind die beschriebenen K_d Werte eher als eine Abschätzung zu verstehen. In der Literatur wird ein K_d Wert von 50-100 μM angegeben, allerdings ist dies auch nur ein Schätzwert der auf Immunopräzipitationsexperimente beruht. Für einen K_d Wert zwischen 50 und 100 μM würde man einen Anstieg der Rate auf ca. 3,5 bis 4,5 Hz erwarten. Weiterhin ist in diesen vorläufigen Experimenten der ^{15}N -markierte Rest jeweils am N- bzw. C-terminus angebracht. Deshalb kann es sein, dass der

markierte Rest noch eine recht hohe interne Mobilität aufweist, obwohl das Peptid an das Protein bindet. Dies würde die gemessene Rate weiter erniedrigen, als sie aufgrund der Bindung eigentlich sein sollte.

4.3.3 Zersetzungsproblem der sulfatierten Peptide

Aus den aufgenommenen NMR-Spektren des CCR5-Nt-Peptides ist zu erkennen, dass sich das Peptid teilweise zersetzt hat. Eine Kontrolle der NMR Probe mittels HPLC-MS bestätigte die partielle Desulfatierung des Peptides.

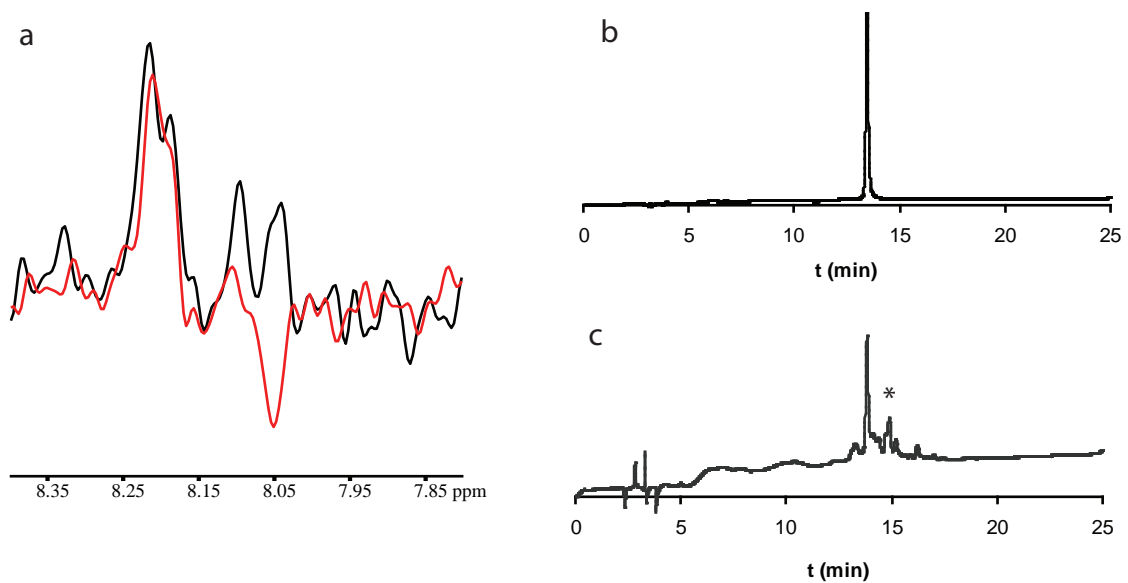


Abbildung 4.17: Desulfatierung des CCR5-Nt-Peptids

a Überlagerung Referenz/Cross-Spektrum, **b** HPLC Chromatogramm synthetisiertes Peptid, **c** HPLC Chromatogramm von dem für die NMR Probe verwendeten Peptidfraktion, der Stern markiert desulfatiertes Peptid

Allerdings liegt das dreifach-sulfatierte Peptid noch zu ca. 70% in der Mischung vor. Es ist also zu erwarten, dass noch genug aktives Peptid vorhanden ist, um bei einer Bindung einen deutlich sichtbaren Effekt zu zeigen. Eine genauere quantitative Auswertung dieser Probe ist jedoch nicht möglich. Um die Wechselwirkung eingehender zu untersuchen ist es notwendig Peptide zu verwenden, die über ihre gesamte Sequenz verteilte ^{15}N Markierungen besitzen. Da das sulfatierte CCR5-Nt-Peptid Probleme in der Stabilität zeigt, wurde in der Literatur nach einem möglichen Ersatz

für Tyr(SO₃) gesucht. Aufgrund der Säurelabilität des Tyrosin *O*-Sulfat wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, ein Mimetikum für das sulfatierte Tyrosin zu finden. Schwerpunkt der Untersuchungen war das CCK Peptid. In der Abb. 4.18 sind die verschiedenen Modifikationen aufgelistet.

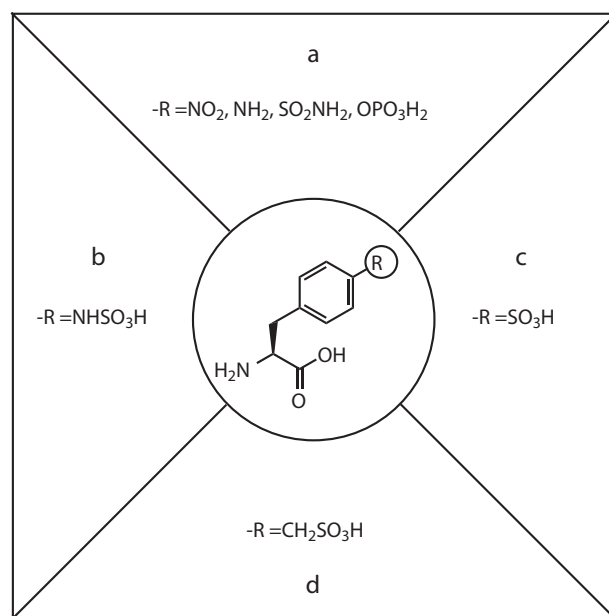


Abbildung 4.18: Übersicht Mimetika: a) sehr geringe Aktivität, b), c) geringe Aktivität, d) hohe Aktivität [142, 143]

Die einzige Modifizierung, welche eine vergleichbare biologische Affinität wie das Tyrosin *O*-Sulfat zeigt, ist das Phe(CH₂SO₃). Interessanterweise führt auch eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes zu einer deutlich verringerten Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde beschlossen, ebenfalls Phe(CH₂SO₃) als Mimetikum für das CCR5 Referenzpeptid zu verwenden [142, 143].

4.4 Synthese eines Tyrosin *O*-Sulfat Mimetikums

In der Literatur sind verschiedene Synthesewege für das Phe(CH₂SO₃)-OH beschrieben. Die erste publizierte Synthese eines Ac-Phe(CH₂SO₃)-OH Derivates von Mars-

eigne et al. aus dem Jahr 1988 ist in Abb. 4.19 dargestellt [142].

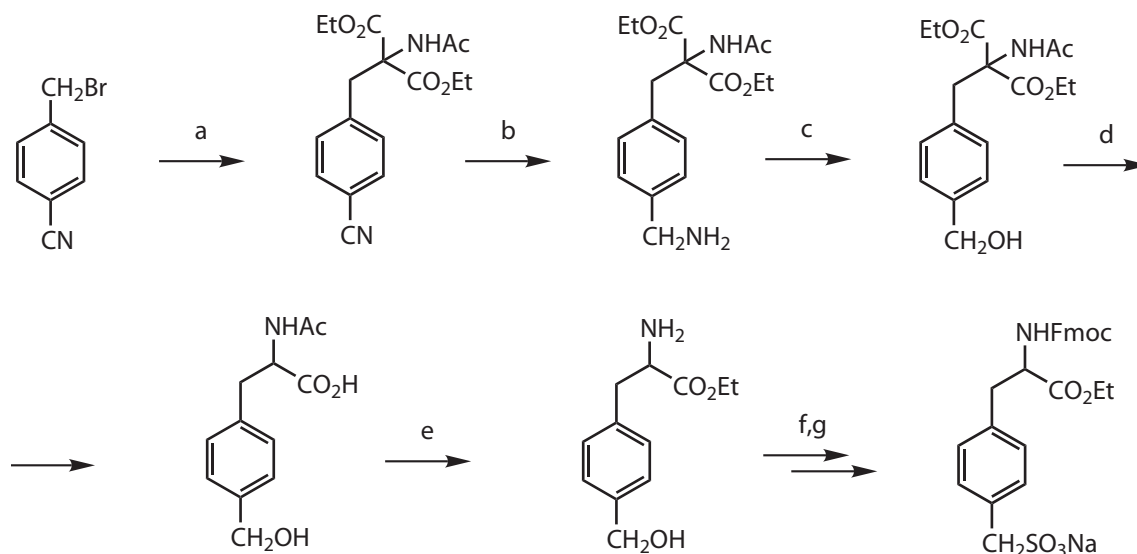


Abbildung 4.19: Synthese von Fmoc-Phe(CH₂SO₃)-OH nach Marseigne et al. [142]

Der Aufbau der modifizierten racemischen Aminosäure wurde über eine klassische Malonestersynthese durchgeführt. Auf vergleichbarem Syntheseweg wurde von Gonzalezmuniz et al. 1991 das Boc-Phe(CH₂SO₃)-OH Derivat synthetisiert [144]. In diesem Fall wurde sowohl die racemische Form als auch durch eine enzymatische Racematspaltung die L-Form erhalten. Der Nachteil dieses Syntheseweges sind die vielen Reaktionsschritte. Außerdem wird die Ausbeute durch die Racematspaltung stark reduziert. Eine Synthese über weniger Reaktionsstufen ist von Miranda et al. beschrieben [145]. Der entscheidende Reaktionsschritt ist die Einführung einer Chlormethylgruppe in das geschützte Phenylalanin. Als Reagenz für die Substitution haben Miranda et al. Chlormethylmethylether verwendet. Zunächst wurde versucht, den Ether durch andere, weniger reaktive Reagenzien wie Trioxan zu ersetzen. Dies führte aber aufgrund des nichtaktivierten Aromaten nicht zum gewünschten Erfolg, so dass letztendlich doch der Chlormethylmethylether notwendig wurde. Dieses Reagenz ist bei dem üblichen Herstellungsweg mit Spuren von Bischlormethylether verunreinigt, welcher ein hoch gefährliches Karzinogen ist. Um dieses Risiko zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit eine von Linderman beschriebene Methode verwendet [146]. Hierbei wurde der Chlormethylmethylether über eine Umesterungsreaktion aus Hexansäurechlorid und Dimethoxymethan hergestellt. Für die Durchführung

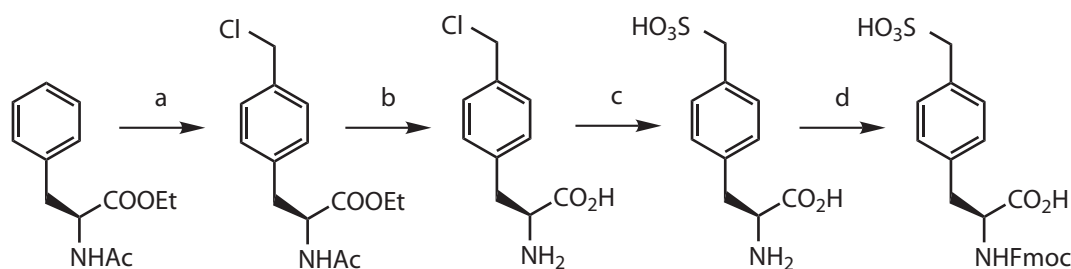


Abbildung 4.20: Synthese von *Fmoc-Phe(CH₂SO₃)-OH* nach Miranda et al. [145]

des Chlormethylierungsschrittes finden sich allerdings widersprüchliche Informationen über die Lewis-Säure in der Literatur. Während Miranda et al. ZnCl_2 als Katalysator verwenden, berichten Schoepfer et al., dass sie dies nicht reproduzieren können und sie stattdessen TiCl_4 verwenden [147].

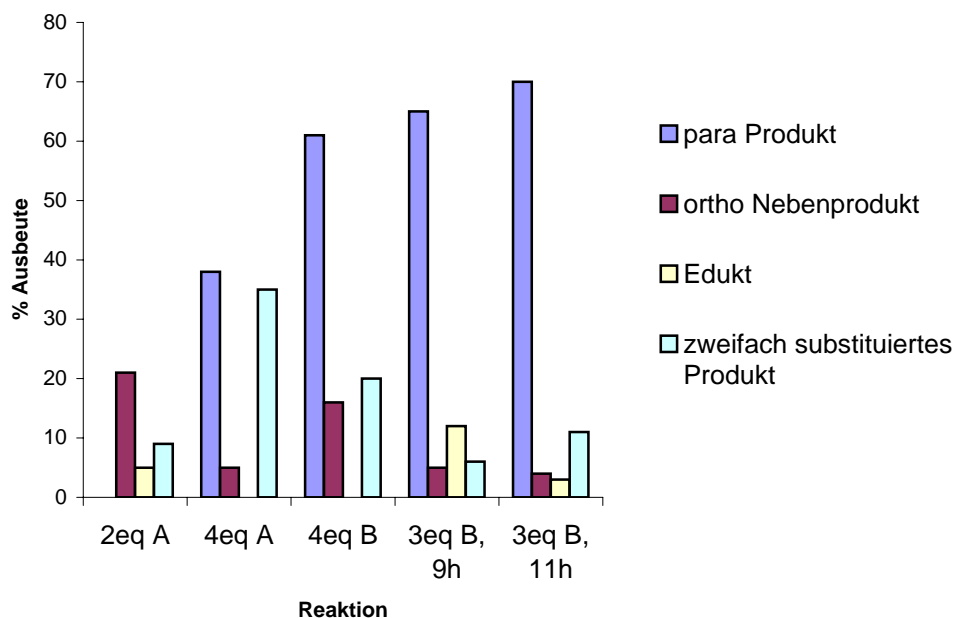


Abbildung 4.21: Optimierung der Chlormethylierung,

A TiCl_4 , B ZnCl_2

Um diesen widersprüchlichen Sachverhalt zu klären, wurden verschiedene Testreaktionen unter den Bedingungen von Miranda und Schoepfer durchgeführt. Dazu wurde nach der entsprechenden Reaktionszeit Proben aus dem Reaktionsgemisch entnommen, mit Methanol versetzt und in der analytischen HPLC untersucht. Die unterschiedlichen Peaks in der HPLC wurden über Massenspektrometrie identifiziert. In Abb. 4.21 sind die Ausbeuten für die jeweiligen Reaktionsbedingungen aufgeführt. Es zeigt sich, dass TiCl_4 ein zu reaktiver Katalysator ist und zu ei-

nem hohem Anteil von zweifach chlormethylierten Produkten führt. Die optimalen Reaktionsbedingungen erhält man für einen dreifachen Überschuß ZnCl_2 und einer Reaktionszeit von 11h bei Raumtemperatur. Da das gewünschte *para*-Produkt durch Kristallisation aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden muß ist es sinnvoll, den Anteil an Nebenprodukten möglichst zu minimieren. Bei der anschließenden Hydrolyse der Schutzgruppen mit 6N HCl wurde eine teilweise Umwandlung der Chlormethylgruppe in den entsprechenden Alkohol beobachtet. Aus diesem Grund wurden die Stufen umgestellt und zuerst die Substitution mit SO_3 und dann die Entfernung der Schutzgruppen durchgeführt. Der Erfolg der Reaktionen wurde jeweils durch HPLC und MS kontrolliert. Nach der Fmoc-Schützung ließ sich die Aminosäure nicht nach dem Standard Flüssig/Flüssig Extraktionsverfahren isolieren, da der Baustein durch die Sulfatgruppe eine zu hohe Wasserlöslichkeit besitzt. Stattdessen wurde das Lösungsmittel komplett entfernt und die modifizierte Aminosäure über eine Soxlett-Extraktion mit THF isoliert. Die optimierte Syntheseroute ist in Abb. 4.22 dargestellt.

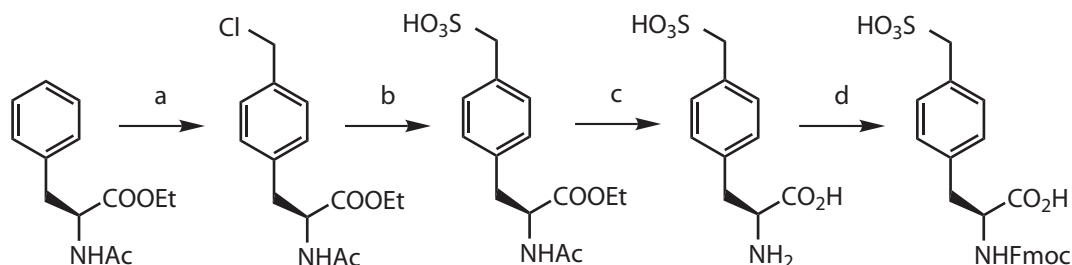


Abbildung 4.22: Modifizierter Syntheseweg Fmoc-Phe(CH_2SO_3)-OH

a) 3eq ZnCl_2 , Chlormethylmethylether, 11h RT, 37% b) 7eq Na_2SO_3 , 3h refluxieren, c) 6N HCl, 2h refluxieren, d) 1.1eq FmocOSu, 2eq Na_2CO_3 , 87% (bezogen auf b)

4.4.1 Versuchter Aufbau

von Phe(CH_2SO_3)-OH durch enantioselective Alkylierung

In den letzten Jahren wurden verschiedene neue enantioselective Synthesemethoden für Aminosäuren entwickelt. Eine Möglichkeit ist die enantioselective Alkylierung

rung von Glyciniminen mit chiralen Phasentransferkatalysatoren auf der Basis von Cinchonidinium -Alkaloiden [148]. Ein Syntheseweg über eine nichtenantioselektive Alkylierung mit anschließender Racematspaltung wurde bereits in der Literatur beschrieben [149]. Ein solcher Weg würde die Synthese um eine Stufe verkürzen. Außerdem könnte man dadurch den Chlormethylierungsschritt umgehen. Die Verwendung von 1,4-Bis-(brommethyl)benzol als Alkylierungsreagenz wurde bereits von Lygo et al. beschrieben [150]. In Abb. 4.23 ist der Syntheseweg aufgeführt.

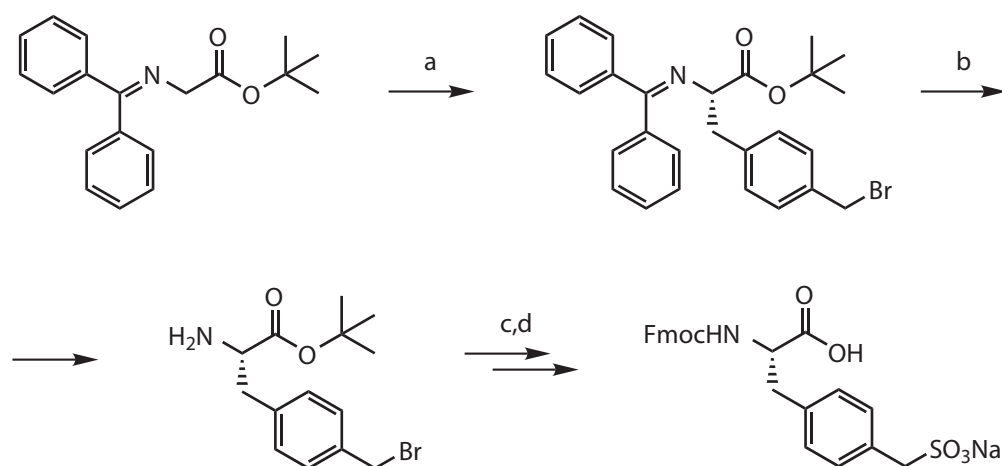


Abbildung 4.23: Syntheseweg der enantioselektiven Synthese von *Fmoc-Phe(CH₂SO₃)-OH*, aufgrund zahlreicher Nebenreaktion wurde die Synthese nicht bis zum Endprodukt durchgeführt

Bei der Durchführung der enantioselektiven Alkylierung traten jedoch eine Reihe von unerwarteten Schwierigkeiten auf. So kam es zu einer Hydrolyse der zweiten Brommethylgruppe zum Alkohol auf. Weitere Nebenreaktionen ergaben sich bei der sauren Hydrolyse des Imins. So wurden nach der Aufarbeitung *N*-Alkylierte Verbindungen isoliert, die von einer Reaktion der freien Aminogruppe mit der Brommethylgruppe stammen. Eine Möglichkeit die Probleme mit der freien Brommethylgruppe zu umgehen besteht darin, eine Schutzgruppe einzuführen, allerdings verlängert dies zusätzlich die Synthese. Durch das Auftreten dieser Nebenreaktionen wurde beschlossen, diesen Reaktionsweg nicht mehr weiter zu verfolgen.

4.5 Synthese des ^{15}N Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH Derivates

Für die tr-CCR Experimente werden ^{15}N Markierungen innerhalb der Sequenz benötigt. Dabei sollte möglichst die gesamte Sequenz vom *N*- bis zum *C*-Terminus abgedeckt werden. Die Auswahl für die Markierung erfolgt durch die Häufigkeit des Auftretens der Aminosäure. Da die Sequenz viermal Serin und zweimal Isoleucin umfaßt wurden diese Positionen für die Markierung ausgewählt. Zusammen mit ^{15}N Tyr, welches im Labor vorrätig war, liegt die Sequenz in sieben Positionen markiert vor. Aufgrund des hohen Preises geschützter ^{15}N Aminosäuren wurden die Aminosäuren ohne Schutzgruppen gekauft und selbst geschützt, zumal die Fmoc Schützung eine etablierte Standardprozedur ist. Im Falle von ^{15}N Serin ist es allerdings notwendig, auch noch die Seitenkette zu schützen. Zu dem Zeitpunkt als die Synthese begonnen wurde, gab es noch kein käufliches ^{15}N Serinderivat, welches an der Seitenkette geschützt war. Für die Schützung der Seitenkette als *t*-Butylether gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Zum einen kann der *t*-Butylrest selektiv an der Seitenkette eingeführt werden. Hierfür müssen die α -Amino- und α -Carboxylgruppen geschützt vorliegen. Dies ist mit klassischer Schutzgruppenchemie ohne weiteres möglich [151], führt aber zu einer deutlichen Verlängerung der Synthese. Eine elegantere Möglichkeit besteht in einer gleichzeitigen Schützung von α -Amino- und α -Carboxylgruppe durch eine chelatisierende Schutzgruppe. Ein in der Literatur beschriebener Syntheseweg unter Verwendung von BF_3 konnte allerdings nicht reproduziert werden [152]. Zum anderen besteht die Möglichkeit, sowohl die Seitenkette als auch die α -Carboxylgruppe komplett mit *t*-Butyl zu schützen. Anschließend muß dann die *t*-Butylgruppe selektiv von der Carboxylgruppe entfernt werden [153, 154]. In Abb. 4.24 ist der Reak-

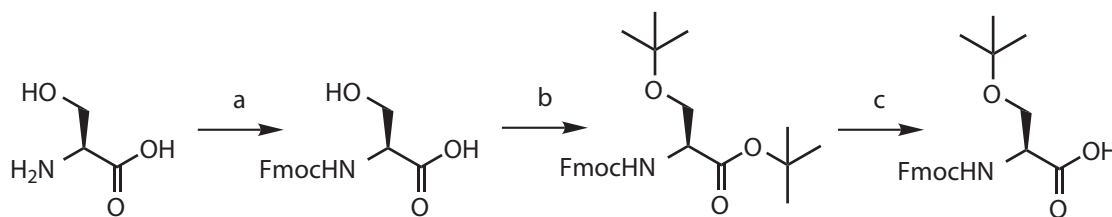


Abbildung 4.24: Synthese von Fmoc-Ser(*t*Bu)-OH

a) FmocOSu, 2eq Na₂CO₃, 81% b) Isobutylen, H₂SO₄, 3d, 70% c) CF₃SO₃Si(CH₃)₃ 46%

Nach dem Einbau des ersten Fmoc-Phe(CH_2SO_3) Restes wurde eine Probeabspaltung vom Harz durchgeführt, um die Effizienz der Kupplung zu kontrollieren (s. Abb 4.26). Der Baustein ist also unter den Abspaltungsbedingungen bei Raumtempera-

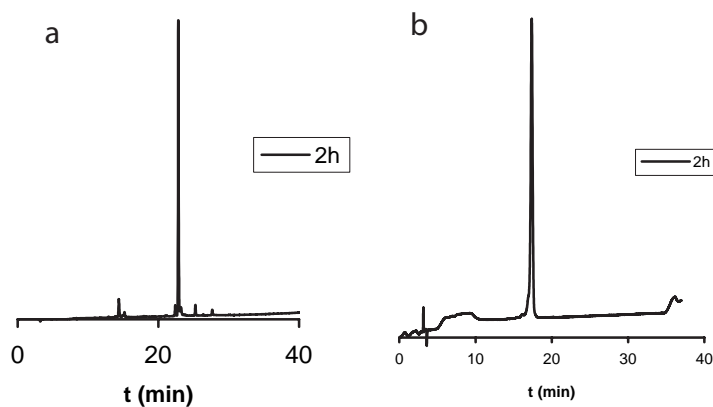


Abbildung 4.26: Synthese CCR5 Peptid

a) Probeabspaltung für $F(\text{CH}_2\text{SO}_3)\text{YTSEPSQK}$ Peptid, b) CCR5 nach HPLC Reinigung, Abspaltungsbedingungen: TFA/ H_2O /TIS (90/5/5), 2h Raumtemperatur

tur vollständig stabil. Das Peptid ist völlig stabil unter stark sauren Bedingungen. Bei einer Abspaltungszeit von 2h unter Raumtemperatur ist kein Anzeichen einer Desulfatierung zu erkennen. Für die Zuordnung des Peptides wurden zum einen DQF-COSY und TOCSY Experimente zur Identifizierung der Spinsysteme und zum anderen NOESY Spektren zur sequentiellen Zuordnung der Spinsysteme und konformationellen Analyse aufgenommen (siehe A). Die Bedingungen für die Herstellung der NMR Probe wurden so gewählt, dass sie mit den Proben für die tr-CCR Messungen vergleichbar sind. Die Spektren wurden also in einem rein wässrigen System aufgenommen, ohne den Zusatz von Stoffen wie Trifluorethanol, welche eventuell transient vorhandene helikale Strukturelemente stabilisieren und somit eine Detektion durch NMR-Spektroskopie erleichtern. Auch wurden die Spektren bei 298K aufgenommen, um eine Vergleichbarkeit mit den biologischen Assays und den tr-CCR Experimenten zugewährleisten. In den Abb.4.27 und 4.28 sind verschiedene Bereiche des NOESY Spektrums bei einer Mischzeit von 300 ms abgebildet.

Aus dem TOCSY und DQF-COSY Spektrum konnten alle Spinsysteme identifiziert werden, wobei die Resonanzen Asp2 und Asp11 und Pro8 und Pro19 jeweils überlagert sind. Die modifizierten Phe(CH_2SO_3) konnten direkt über die zusätzlichen NOESY Peaks zwischen den CH_2SO_3 Gruppe und den Aromaten identifiziert wer-

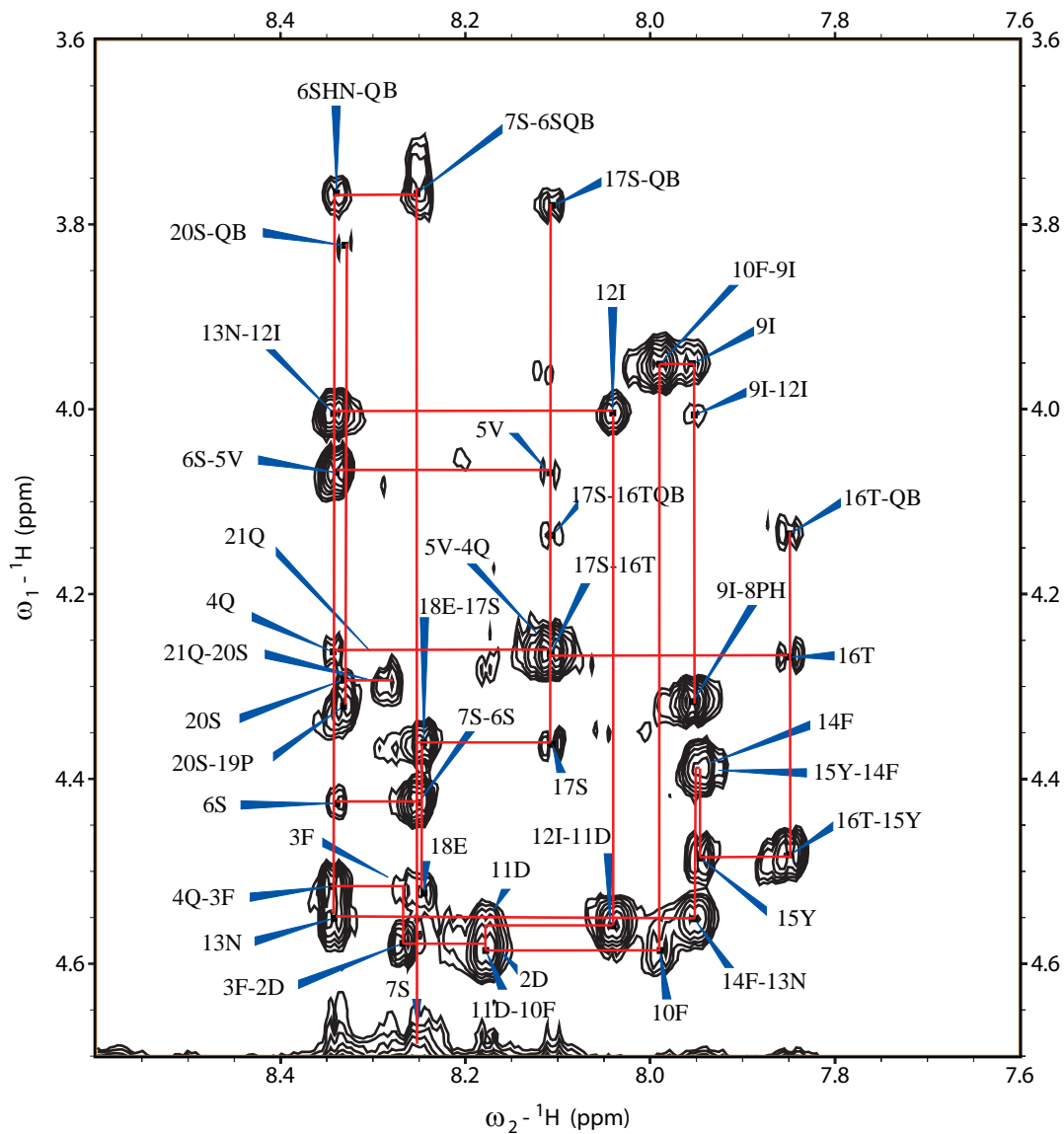


Abbildung 4.27: NH-HA Fingerprint Region des NOESY Spektrums, Probe : 1 mM Peptid, 250 μ l Puffer (100 mM Phosphat, 50 mM NaCl, pH = 7)+7% D₂O, Aquisitionsparamter: t₁ 512, sw 9.054 ppm, t₂ 4096, sw 9.054 ppm, 64 scans, 32 dummy scans, Mischzeit 300 ms, Relaxationsdelay 1.4 s, T = 298K

den. Die sequentielle Anordnung der Spinsysteme erfolgte über die $d\alpha N$ Kreuzpeaks. Die $^{15}N, H$ Resonanzen sind alle gut separiert, bis auf Tyr15 und Ile9, welche überlagert sind. In dem NOESY Spektrum ist auch bei einer langen Mischzeit von 300 ms nur intraresiduale und sequentielle NOE Kontakte zu erkennen. So finden sich für Phe3 bis Ser7, Ile9 bis Glu18 und Ser20 bis Gln21 dNN und $d\alpha N$ Kreuzpeaks. Desweiteren sind auch $d\beta N$ Kreuzpeaks für Val5 bis Ser7 und Ile9 bis Glu18 zu beobachten. Sowohl Met1 als auch Lys22 zeigen keine Kreuzpeaks im NOESY Spektrum. Die Prolinreste zeigen beide $H^\delta (P_i + 1) - H^\alpha (i)$ Kreuzpeaks. Es finden sich insgesamt nur drei NOE Kontakte mittlerer Reichweite, wobei zwei davon extrem schwache Signale liefern. Die Verteilung der Resonanzen zeigt das typische Bild eines *random coil* Peptides. Die NH Resonanzen befinden sich zwischen 8,34 ppm und 7,85 ppm und liegen damit sehr nah an ihre *random coil* Werten [155]. Auch die geringe Dispersion der HA Signale zeigt das Fehlen typischer Sekundärstrukturelemente an. Die Abwesenheit von NOE Kontakten mittlerer bzw. langer Reichweite bestätigt das Fehlen einer bevorzugten Sekundärstruktur. Dies ist auch aufgrund der Größe und Sequenz dieses linearen Peptides in einem rein wäßrigen System nicht zu erwarten, wie z.B. eine Vorhersage von Sekundärstrukturelementen anhand der Sequenz ergibt. In einer erst kürzlich erschienen Publikation über die NMR-spektroskopischen Untersuchungen eines CCR5-Nt-Peptides berichten die Autoren, dass das Peptid strukturiert vorliegt [141]. Dies lässt sich anhand der von uns aufgenommen Spektren nicht bestätigen. Allerdings sind die Probe und die Messbedingungen nicht identisch. So verwendeten die Autoren ein nichtsulfatiertes Nt-Peptid, obwohl mehrere Literaturstellen auf die Bedeutung der Sulfatierung hinweisen. Weiterhin wurden in der Publikation die Spektren bei 278K aufgenommen und nicht wie in unserem Fall bei 298K.

4.6.1 tr-CCR Experimente

Die tr-CCR-Experimente wurden zunächst mit einem zehnfachen Überschuß Ligand im Verhältnis zum Protein vorgenommen. In Abb. 4.29 sind die CCR-Raten aufgeführt. Diesmal lassen sich auch die Signale für die Markierungen innerhalb des Peptides erhalten. Die Raten für das freie CCR5-Nt-Peptid liegen im Bereich zwei

bis dreieinhalb Hertz und zeigen damit eine gute Übereinstimmung mit den Messungen des einfach markierten CCR5 Peptides. Allerdings sind unter den Meßbedingungen die Signale für Ser6, Ser7, Ser17 und Ser20 im Kreuzexperiment für die CCR5-Nt/gp120/sCD4 Probe nicht zu beobachten. Die Ursache dafür kann in einem schnellen Austausch der Amidprotonen mit dem Wasser liegen. Durch die teilweise Überlappung des Ile9 und Tyr15 Signals lassen sich die Werte für die Raten nur ansatzweise verwenden. Die Messungen wurden nochmal mit etwas veränderten Meßbedingungen durchgeführt. So wurde der pH Wert der neuen Probe auf $pH = 7$ eingestellt, um einen Austausch der Amidprotonen etwas zu verlangsamen. In Abb. 4.30 sind die gemessenen CCR-Raten aufgeführt. Unter diesen Bedingungen sind alle Signale für die ^{15}N -markierten Aminosäuren bis auf das Signal von Ser20 im Cross-Spektrum zu beobachten. Die Signale für Tyr15 und Ile9 sind teilweise überlagert und können daher nur näherungsweise für die Auswertung verwendet werden. In Abb. 4.31 sind die gemessenen CCR-Raten aufgelistet. Man erkennt trotz des eher geringen Überschuß an Liganden (30/1) nur einen sehr schwachen Anstieg der Rate. In diesem Fall ist die gemessene Rate für den Peptid/gp120/sCD4 Komplex am größten. Durch die größere Korrelationszeit des ternären CCR5-Nt/gp120/sCD4

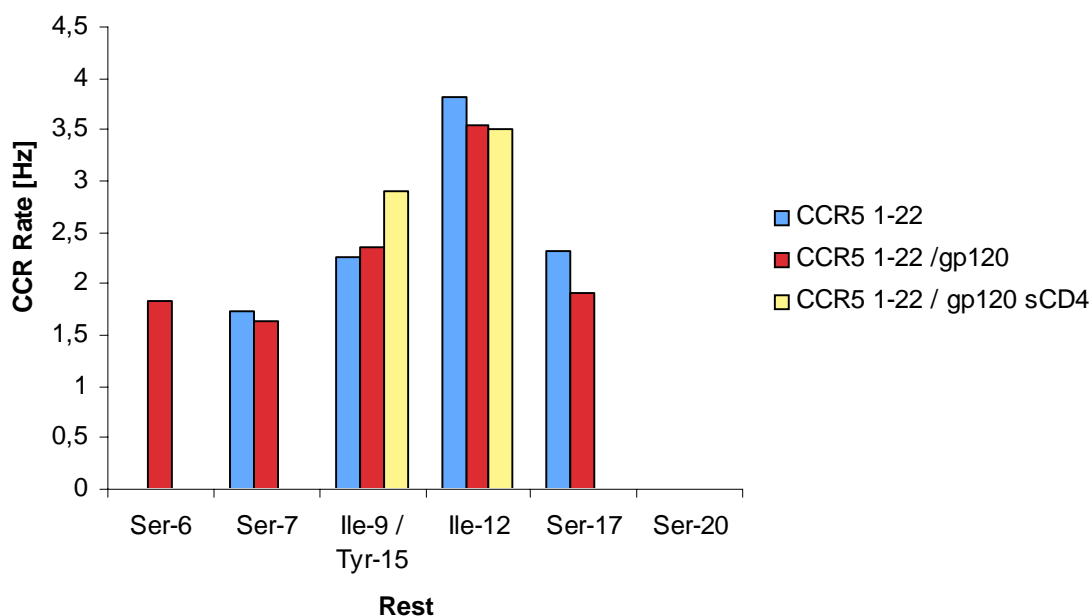


Abbildung 4.29: $\Gamma(N,NH)$ für das modifizierte CCR5-Nt-Peptid, Probe: $11 \mu M$ gp120, sCD4; $111 \mu M$ Peptide, $250 \mu l$ PBS Puffer $pH 7.3$

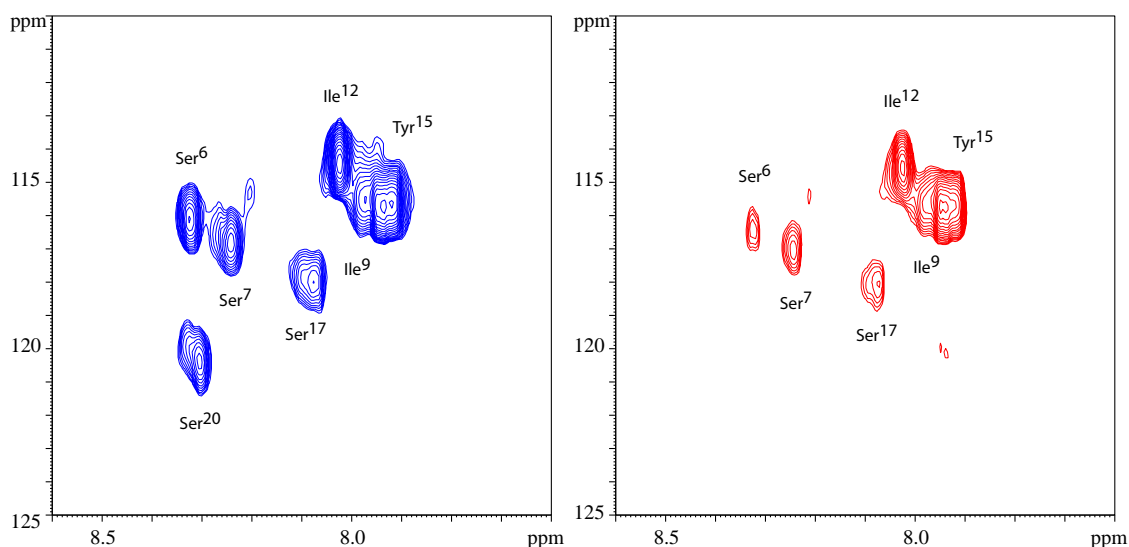


Abbildung 4.30: Referenz-Spektrum (blau) und Cross-Spektrum (rot) für die gp120/sCD4/CCR5-Nt Probe

Im Cross-Spektrum ist kein Signal für Ser20 zu beobachten. Probe: 4 μM gp120, sCD4; 30 μM Peptide, 250 μl Puffer (10mM Phosphat, 10mM NaCl pH = 7), Aquisitionsparameter: t_2 2048, sw 10.0176 ppm, t_1 32, sw 41,122 ppm Relaxationsdelay 2s, 32 scans, $T = 298\text{K}$, im Kreuzexperiment wurde die Anzahl der Scans auf 512 erhöht

Komplexes liegen die ermittelten K_d Werte höher als für die anderen Messungen. Auch wenn die Werte für Ile9, Tyr15 durch die teilweise Überlappung nur ungenau bestimmt werden können, liegen die K_d im selben millimolaren Bereich [s. Tab. 4.4 wie für die anderen Reste. Aufgrund der vergleichbaren K_d in den unterschiedlichen Messungen scheint es sich eher um eine unspezifische Wechselwirkung zu handeln. Allerdings sind die Unterschiede der Raten äußerst gering und liegen teilweise noch innerhalb der Fehlergrenze der Messungen. Als zusätzliche Informationsquelle wurden ^{15}N editierte NOESY Spektren aufgenommen um eventuell auftretende tr-NOE Effekte zu beobachten. Hier zeigte sich jedoch ebenfalls kein Anstieg in der normalisierten Kreuzpeakintensität der gp120/sCD4/CCR5 Peptid Mischung im Vergleich zum freien Peptid.

[¶] Der angegebene Fehler bezieht sich auf die Messgenauigkeit der Raten. Durch Ungenauigkeiten in dem Peptid/Protein Verhältnis ist der Fehler noch größer

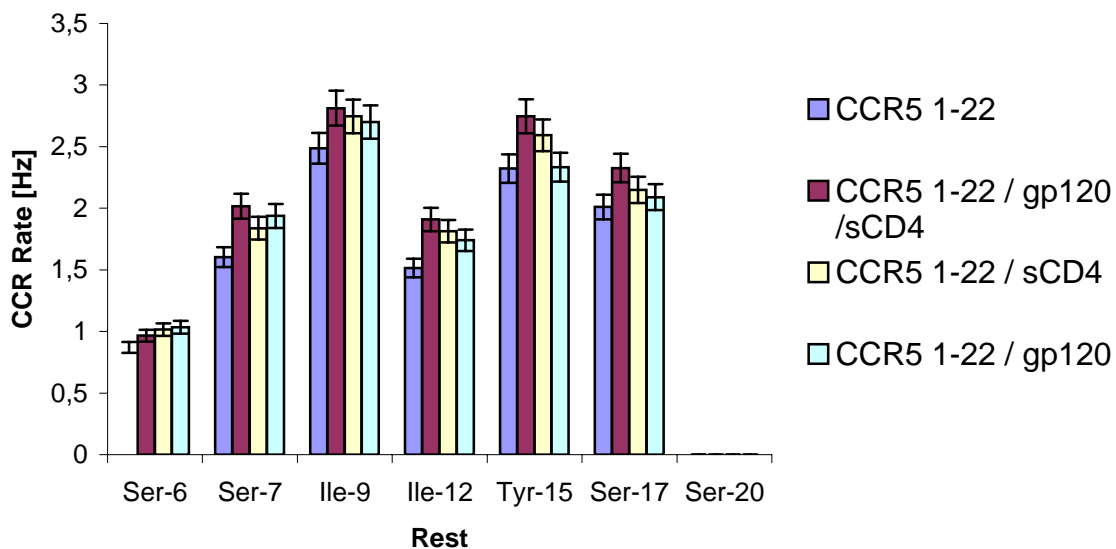


Abbildung 4.31: $\Gamma(N,NH)$ für das modifizierte CCR5-Nt-Peptid, Probe: $4 \mu M$ gp120, sCD4; $30 \mu M$ Peptide, $250 \mu l$ Puffer ($10mM$ Phosphat, $10mM$ NaCl pH 7), der Fehler wurde über das Aufaddieren von Noise auf die Signale bestimmt

		CCR5-Nt	CCR5-Nt/gp120	CCR5-Nt/sCD4	CCR5-Nt/sCD4/gp120
Ser6	$\Gamma(N,NH)$	$0,86 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,05$	$1,01 \pm 0,05$	$0,96 \pm 0,05$
	K_d ¶		1434 ± 100	1306 ± 90	3241 ± 230
Ser7	$\Gamma(N,NH)$	$1,6 \pm 0,08$	$1,93 \pm 0,10$	$1,83 \pm 0,09$	$2,01 \pm 0,10$
	K_d		728 ± 50	837 ± 60	780 ± 55
Ile9	$\Gamma(N,NH)$	2,48	2,69	2,74	2,81
	K_d		1129	727	959
Ile12	$\Gamma(N,NH)$	$1,51 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,05$	$1,81 \pm 0,05$	$1,90 \pm 0,06$
	K_d		1048 ± 62	642 ± 40	821 ± 49
Tyr15	$\Gamma(N,NH)$	2,32	2,33	2,59	2,74
	K_d		23868	702	754
Ser17	$\Gamma(N,NH)$	$2,01 \pm 0,10$	$2,09 \pm 0,11$	$2,14 \pm 0,11$	$2,32 \pm 0,12$
	K_d		2995 ± 210	1472 ± 104	1028 ± 73

Tabelle 4.4: K_d Werte CCR5-Nt-Peptid

4.6.2 STD NMR Experimente

Die verschiedenen NMR Methoden stellen unterschiedliche Anforderungen an die kinetischen Eigenschaften des Protein/Ligand-Komplexes. Möglicherweise ist die Bindung zu stark für tr-CCR und nur mit STD zu beobachten, da die Rate wie vorn dargelegt viel kleiner sein kann. Aus diesem Grunde wurde beschlossen, als weitere Methode STD NMR zu verwenden. In Abb.4.32 sind die Resultate zusammengefasst. Bei den beobachteten Signalen handelt es sich jedoch nicht um Signale von dem Pep-

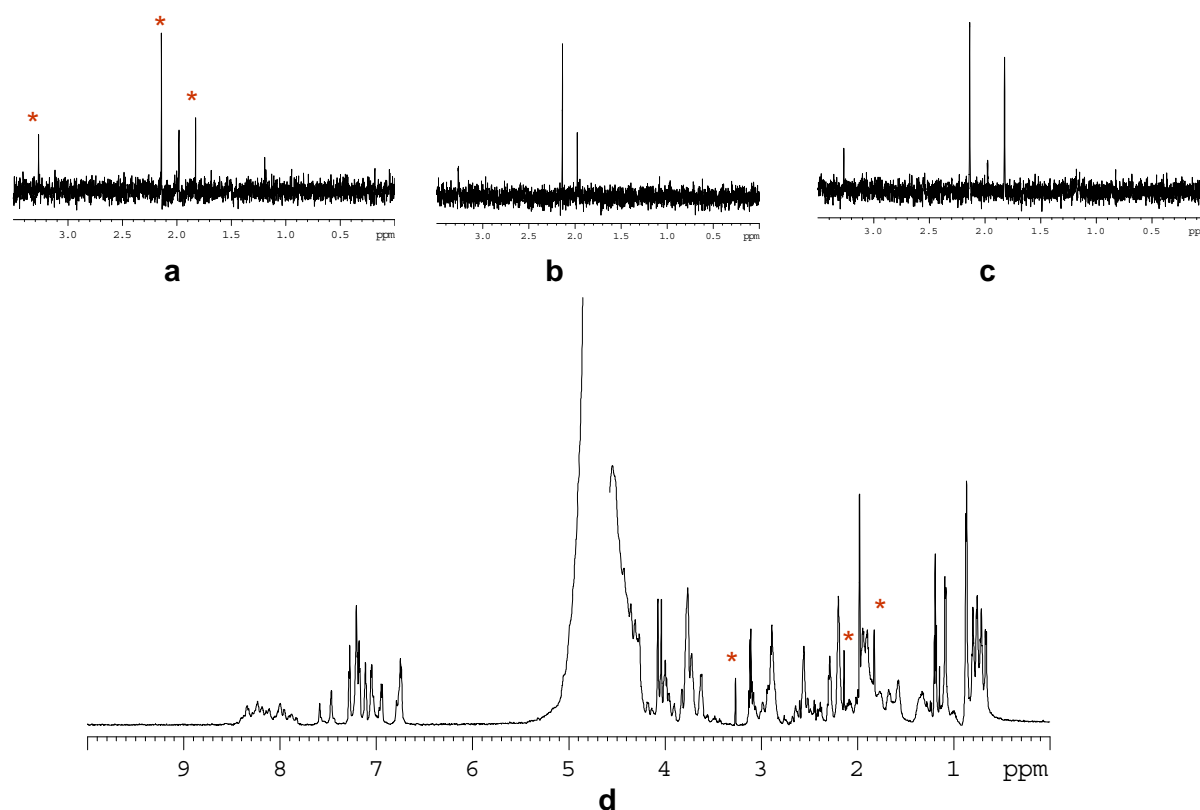


Abbildung 4.32: Ergebnisse STD NMR,

a STD-Spektrum CCR5 Peptid, die markierten Signale gehören nicht zum Peptid, **b** STD-Spektrum gp120/CCR5 Peptid, **c** STD-Spektrum gp120/sCD4/CCR5 Peptid, **d** 1D-Spektrum CCR5 Peptid, die markierten Signale gehören nicht zum Peptid

tid, wie sich durch den Vergleich mit anderen Spektren und den sehr unterschiedlichen Linienbreiten erkennen lässt. Die Verunreinigung stammt aus der Peptidprobe. In den Mischungen Peptid/gp120 bzw. Peptid/gp120/sCD4 ist kein STD Effekt an den Peptidsignalen zu beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit den anderen NMR Experimenten ein weiterer Hinweis, dass keine bzw. nur eine äußerst schwache

Wechselwirkung vorliegt. Die Pulssequenz wurde an einem anderen Protein/Ligand System, welches in der Abteilung untersucht wird, getestet. In diesem Fall zeigt das Differenzspektrum eindeutig die Bindung des Liganden. In einer kürzlich erschienenen Thesis aus der Arbeitsgruppe von Bernd Meyer wurde die Wechselwirkung von CCR5-Nt-Peptiden und gp120 mittels STD-NMR untersucht [156]. Allerdings wurden in dieser Arbeit andere gp120 Varianten verwendet, so dass ein direkter Vergleich der Arbeiten schwierig ist.

4.7 HIV Entry Assay

Die HIV Entry Assays wurden vom Kooperationspartner im Georg-Speyer-Haus durchgeführt. Sie bestehen aus einem etablierten Chemilumineszenz-Assay, in welchem die Luciferaseaktivität nach Eintritt des Virus in die Zelle gemessen wird. Die Tests wurden zum einen mit HIV-1 117DIII und zum anderen mit MLV Partikeln mit gp120 JR-FL durchgeführt. Als Kontrolle wurden bekannte HIV-1 Entry Inhibitoren wie T-20 und 2F5 verwendet. T-20 ist ein seit 2003 zugelassener Wirkstoff [siehe S.18] und 2F5 ein CD4i Antikörper [157]. Wie aus Abb. 4.33 zu entnehmen

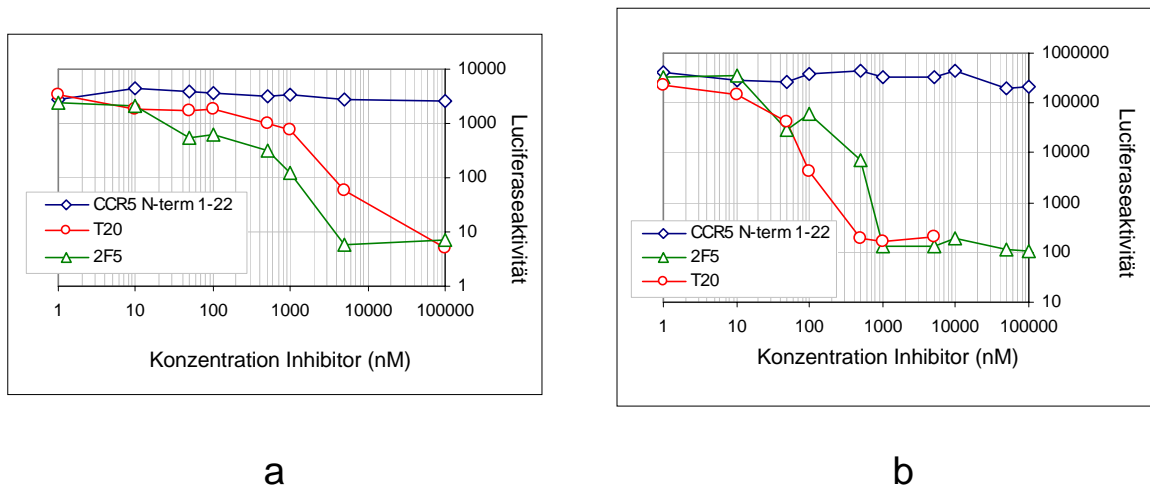


Abbildung 4.33: HIV Inhibitionsdaten für das CCR5 Peptid (Xavier Derville, Georg-Speyer-Haus), a) 2F5 und T20 sind bekannte HIV Inhibitoren, auf der y-Achse ist die Luciferaseaktivität aufgeführt

ist, zeigt das modifizierte CCR5-Nt-Peptid nur eine geringe Inhibition bei einer

sehr hohen Konzentration von $100\mu\text{M}$. Dieser geringe Effekt ist im Einklang mit den Resultaten aus den NMR Experimenten. Weiterhin sind die Resultate in der gleichen Größenordnung wie die publizierten Inhibitionsdaten von Cormier für ihr CCR5-Nt-Peptid. Die Etablierung eines ELISAs für die Peptide zeigte ebenfalls keine Bindung. Dies entspricht den Aussagen von Farzan, die mit ihrem Peptid ebenfalls keinen Effekt in ELISAs feststellen konnten. Ein schwach bindendes Peptid wie das CCR5-Nt-Peptid wird durch die zahlreichen Waschschrte in einem ELISA einfach entfernt.

4.8 Synthese eines CD4 Miniproteins

In der Literatur ist die Verwendung von verschiedenen CD4-Miniproteinen beschrieben, welche eine vergleichbare biologische Aktivität wie sCD4 besitzen [siehe S.14]. Da für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen größere Mengen an sCD4 benötigt werden, welches von entsprechenden Firmen bezogen werden muss, stellt die Verwendung eines selbstsynthetisierten CD4 Ersatzes eine interessante Alternative dar. Von den unterschiedlichen publizierten CD4 Miniproteinen wurde das CD4M33 für einen Test ausgesucht, da es das am weitesten optimierte Miniprotein mit der höchsten Affinität zu gp120 darstellt [36, 37].



Die Thiopropionsäure (Tpa) wurde mit einer Tritylschutzgruppe am Schwefel eingebaut [158]. Im CD4M33 befindet sich an Position 23 ein Biphenylrest. Dieser wurde gegen Phenylalanin ausgetauscht, da dies nach Informationen aus dem Georg-Speyer-Haus keine wesentliche Affinitätsänderung hervorrufen sollte. Das Peptid wurde im Georg-Speyer-Haus auf seine Fähigkeit CD4i-Epitope zu indizieren untersucht. Als Antikörper wurden der 17b- und GC10-Antikörper verwendet (siehe S. 53). In Abb.4.34 sind die Ergebnisse aufgeführt.

Das CD4M33 erzeugt die CD4i-Epitope, allerdings ist der Effekt deutlich weniger ausgeprägt als beim sCD4. Auch zeigt das CD4M33 im Gegensatz zu dem sCD4 eine sehr unterschiedliche Aktivität gegenüber den beiden Antikörpern. Da die gemessen

Affinitäten der Peptide nur sehr gering sind wurde beschlossen für die NMR Experimente das sCD4 zu verwenden, um die ohnehin geringen Effekte in den CCR-Raten nicht noch weiter abzuschwächen.

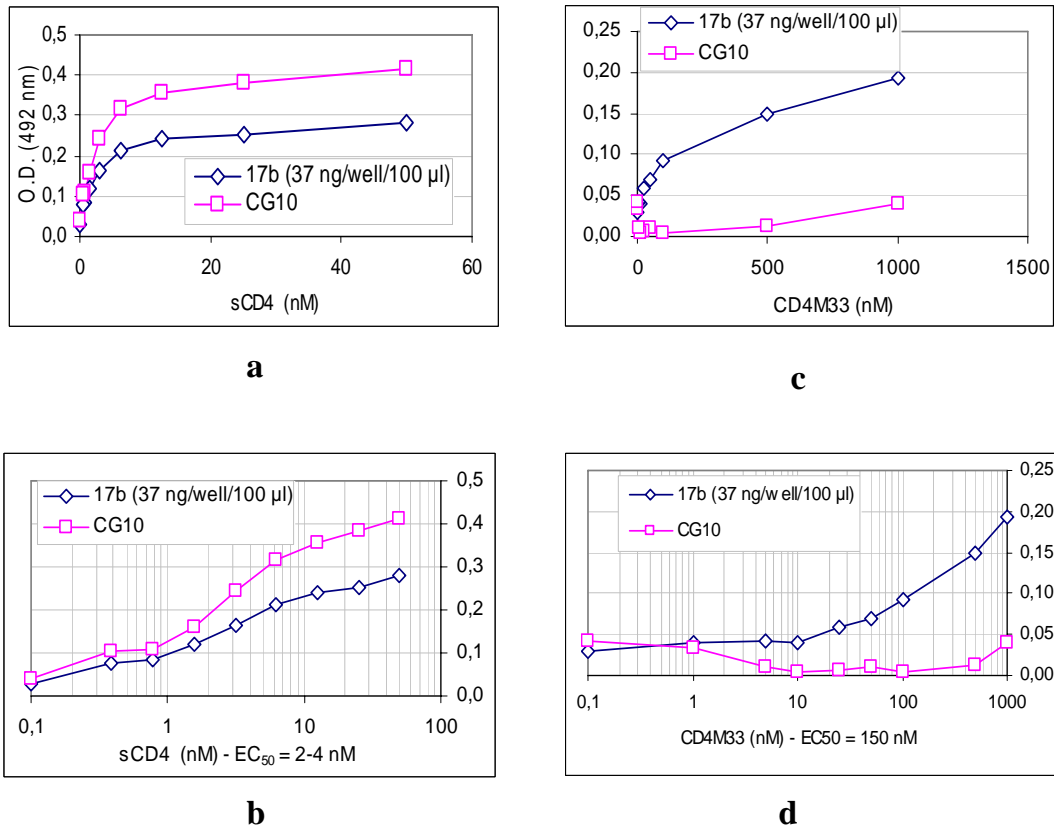


Abbildung 4.34: Vergleich Aktivität sCD4 / CD4M33 (Xavier Dervillez, Georg-Speyer-Haus) 17b und GC10 sind zwei Antikörper für die CD4i-Epitope. Das synthetisierte CD4M33 (c,d) zeigt eine deutlich niedrigere Aktivität als das sCD4 (a,b), auch ist die Aktivität des CD4M33 für die zwei verwendeten Antikörper sehr unterschiedlich

Kapitel 5

Entwicklung einer säurelabilen Seitenkettenschutzgruppe für Asparagin und Glutamin

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die Säureempfindlichkeit der Tyrosin-*O*-Sulfatierung ein großes Problem in der Peptidsynthese. Für viele Aminosäuren gibt es Seitenkettenschutzgruppen, welche unter sehr milden sauren Bedingungen entfernt werden können. Im Fall von Asparagin und Glutamin gibt es momentan nur wenige Schutzgruppen, die diese Kriterien erfüllen. Die Entfernung der Tritylschutzgruppe erfordert eine hohe Konzentration an TFA und im Falle von *N*-terminalen Asn auch eine deutlich verlängerte Abspaltungszeit. Es sind einige weitere Schutzgruppen bekannt, die allerdings nicht kommerziell erhältlich sind. Die bislang interessanteste Alternative stellt die von Carpino entwickelte Cyclopropyldimethylcarbinyl Gruppe dar. Die entsprechend modifizierten Asn und Gln Derivate werden mittlerweile von der Fa. NovaBiochem angeboten. Auch wenn die Abspaltung im Vergleich zur Tritylgruppe deutlich geringere Säurekonzentration erfordert, sind die Bedingungen für stark säurelabile Gruppen wie Tyrosin-*O*-Sulfat immer noch zu drastisch. Im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde die Idee entwickelt, die Dimethoxytrityl(DMT)Schutzgruppe als Seitenkettenschutzgruppe für Asn und Gln zu verwenden. Die DMT Gruppe wurde intensiv als Hydroxylschutzgruppe in der Nukleotid und Oligonukleotidsynthese verwendet und stellt die routinemäßig verwendete Schutz-

gruppe in der Festphasensynthese von DNA und RNA dar. Als Schutzgruppe für Carboxamide gibt es nur äußerst wenige Anwendungen. Bislang sind jedoch keine Anwendungen in der Peptidsynthese bekannt. Im Folgenden findet sich eine erste Fassung der geplanten Publikation. Es stehen noch einige experimentelle Arbeiten aus. Da die synthetisierten Fmoc-Asn(DMT)-OH bzw. Fmoc-Gln(DMT)-OH Derivate bei Lagerung teilweise Stabilitätsprobleme zeigten, wird versucht die Stabilität durch Umwandlung in das entsprechende Dicyclohexylammoniumsalz zu erhöhen. Außerdem ist noch die Synthese weiterer Testpeptide geplant.

Application of the DMT group as side chain carboxamide protection in peptide synthesis

Volker Klaukien, Andrei Leonov, Christian Griesinger

Max-Planck Institute for biophysical chemistry, Department of NMR-based structural biology
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen, Germany

Abstract: The dimethoxytrityl (DMT) group was used as a side chain protecting group for asparagines and glutamine in Fmoc solid phase peptide synthesis. The two newly developed derivatives, Fmoc-Asp(DMT)-OH and Fmoc-Gln(DMT)-OH have been used for the synthesis of several peptides like . The DMT can be removed with 1% TFA / Scavenger in 1 hour. This makes it an ideally suited protecting group for the synthesis of highly acid sensitive peptides like tyrosine *O*-sulfated peptides.

Abbreviations: As recommended in J. Pept. Sci. 2006; 12, 1-12

Keywords: Fmoc-solid phase synthesis, Asn protection, Gln protection, dimethoxytrityl protecting group, sulfated peptides

Introduction

The side-chain carboxamide group of asparagine and glutamine can give rise to various side reactions in solid phase peptide synthesis [1]. With all the disadvantages of unprotected asparagines and glutamine residues in peptide synthesis the development of new protecting groups that can be cleaved under very mild acidic conditions is an important task.

With the introduction of the trityl group [2] a lot of these problems could be solved. However, the removal of the trityl group requires high concentration of TFA and in the case of *N*-terminal Asn also extended cleavage time [3,4]. Several other groups like analogues of Xanthenyl (Pics) have been reported [5,6]. Recently, the cyclopropyldimethylcarbinyl group has been proposed by Carpino as a new acid labile protecting group [7]. Introduction of the 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl (Mtr) group results in a 2 or 3 times faster cleavage rate compared to the trityl group [8]. Despite all these developments, there is still a need for the development of protecting groups for the synthesis of highly acid labile peptides like sulfated peptides. Generally, the strategies for the synthesis of tyrosine *O*-sulfate peptides rely on the minimization of side chain protecting groups or the usage of protecting groups that can be removed under conditions that do not cause desulfation of the tyrosine residue.

We examined the dimethoxytrityl group (DMT) as side chain protecting group for asparagine and glutamine in solid phase peptide synthesis. The DMT group has been extensively used for the protection of hydroxyl groups in carbohydrate, nucleoside and oligonucleotide chemistry [9]. DMT was first introduced in oligonucleotide synthesis by Khorana in 1962 and is still the preferred hydroxyl protecting group for oligonucleotide synthesis [8]. There are only a few reports for the usage as amine or carboxamide protection [10]. However, to the best of our knowledge no application as carboxamide protecting group in peptide synthesis has been described so far.

Results and Discussion

At first we tried to incorporate the DMT by a similar procedure used for the trityl group [2]. The acid-catalyzed tritylation of the ω -carboxamide of asparagine with dimethoxytrityl alcohol did not succeed. Next we tried to introduce the residue by coupling of the dimethoxytritylamine with the side chain carboxyl group. Similar results are reported for

the trityl group, where a direct coupling using DCC/HOBt was not successful [2]. Due to this very low nucleophilicity of the DMT-NH₂ we used the Fmoc-Asp(Cl)-OBzl for the coupling. In this way, the reaction could be carried out in nearly quantitative yields (figure 1). For the synthesis of Fmoc-Gln(DMT)-OH another approach had to be used since the activation of the carboxyl group yielded the Pyroglutamine compound in quantitative yield. Finally a HATU/DIEA activation protocol was used for the coupling (figure 2).

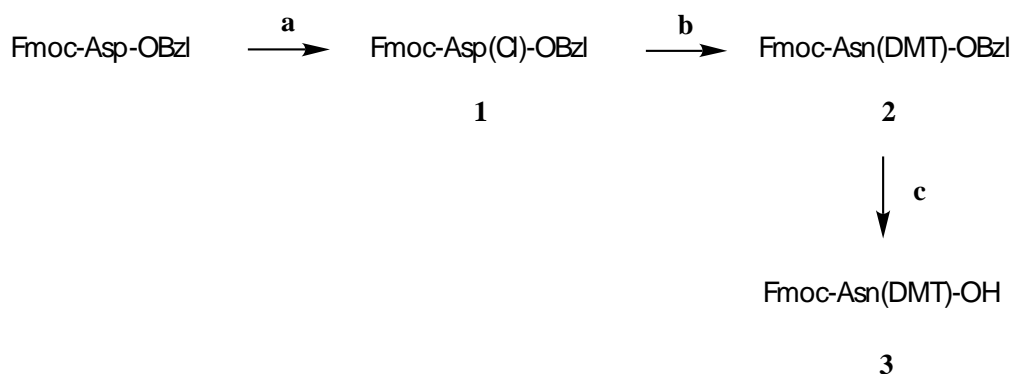


Figure 1: Synthesis of Fmoc-Asn(DMT)-OH

a) (COCl)₂, b) DMT-NH₂, 94% c) H₂, Pd/C, 72%

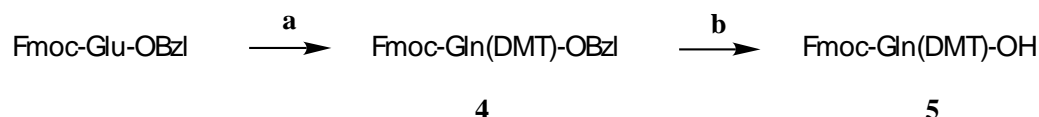


Figure 2: Synthesis of Fmoc-Gln(DMT)-OH

a) DMT-NH₂, HATU/DIEA, 61% b) H₂, Pd/C, 58%

The ω-DMT protection of asparagines and glutamine is rapidly cleaved under room temperature. Table 1 shows the deprotection of Fmoc-Asn(DMT)-OH under different cleavage conditions. Table 2 shows the deprotection of Fmoc-Asn(Trt)-OH under the same cleavage conditions as for Fmoc-Asn(DMT)-OH.

Table 1: Cleavage of Fmoc-Asn(DMT)-OH under different acidic conditions

	1h	2h	4h	7h
80% AcOH	-	7	-	-
1N HCl / Dioxan	-	4	-	7
1% TFA / DCM	26	-	36	-
1% TFA / 5% TIS	-	90	95	-
1% TFA / 5% EDT	-	91	95	-
5% TFA / DCM	-	30	-	34
5% TFA / 5% TIS	-	100		

Table 2: Cleavage of Fmoc-Asn(Trt)-OH under different acidic conditions

	1h	2h	4h	7h
1N HCl / Dioxan	-	0	-	0
1% TFA / 5% TIS	-	1	1	-
1% TFA / 5% EDT	-	1	1	-
5% TFA / DCM	-	9	-	65
5% TFA / 5% TIS	-	25	-	50

The DMT group is stable against catalytic hydrogenation, 50% 1N HCl in dioxan, 80% acetic acid/water, 20% piperidine/DMF. Since the deprotection is a reversible reaction addition of scavengers like TIS or EDT is needed for a complete removal. Using 1% TFA and 5% scavenger in DCM, the DMT group is completely removed after 2h. Under these conditions, the ω -trityl derivative showed no reactivity. The application of the ω -DMT protection was demonstrated by the synthesis of several peptides. Peptide NVPEPS [11] was chosen as a test peptide because it is known that the removal of *N*-terminal trityl protecting group requires extended cleavage times. The removal of the DMT group from *N*-terminal Asn proceeds rapidly, as shown in Figure 1.

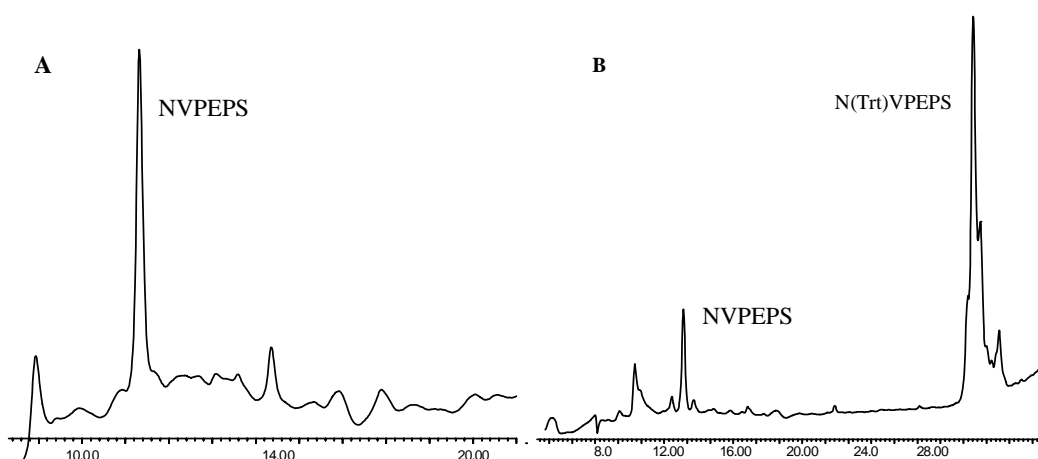


Figure 1: a) HPLC of crude NVPEPS after 1h cleavage, Synthesis with Fmoc-Asn(DMT)-OH
b) HPLC of crude NVPEPS after 1h cleavage, synthesis with Fmoc-Asn(Trt)-OH

Materials and Methods

Fmoc-Asp-OBzl and Fmoc-Glu-OBzl were purchased from Bachem.

All chemicals were commercially available unless otherwise noted. Solvents and Scavengers were purchased from Aldrich. Protected Fmoc-L-amino acids were purchased from Merck Biosciences. The sidechains of amino acids were protected as follows: Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH. Peptides were synthesized using Rink Amid resin with an Applied Biosystem 433A peptide synthesizer using Fmoc chemistry. Thin layer chromatography: Machery-Nagel precoated sheets, 0.25 mm Polygram SIL G/UV254 plates, detection with

UV, Ninhydrin, or 10wt % ethanolic phosphomolybdic acid, Flash column chromatography was done with Merck silica gel 60 (0.015-0.040 mm) Analytical high performance liquid chromatography was done by a Jasco System on a RP18 column using a gradient of 0.1 % TFA H₂O / 0.1 % TFA CAN. The monitoring of the DMT deprotection was done with HPLC by a triethylammonium buffer / ACN gradient. ESI-MS spectra were obtained by using a Waters Micromass ZQ 4000 mass spectrometer. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded by using a MS Finnigan LCQ mass spectrometer, optical rotations were recorded by using a Perkin Ellmer 241 digital polarimeter NMR spectra were recorded at 298K at a 400MHz Bruker Avance spectrometer.

Conclusion

The DMT group can be conveniently introduced as side chain protecting group for asparagines and glutamines. Removal of the group can be carried out under very mild conditions. Compared to other groups like trityl, 4-methyltrityl cleavage rates are significantly enhanced, even if the group is positioned in the *N*-terminal position. This group is fully compatible with standard Fmoc-chemistry protocols. The enhanced cleavage rate under mild acidic conditions makes it well suited for the synthesis of Tyrosine *O*-sulfated peptides.

Acknowledgment:

This work was supported by the Volkswagen Stiftung

DMT-NH₂ [12]

NH₃ (100 ml) was condensed under argon. Dimethoxytritylchlorid (15g, 44 mmol) was added at RT via a riser tube. The riser was washed with 15ml THF. The mixture was stirred for 16h. The excess of NH₃ was removed by evaporation. The residue was dissolved in CH₂Cl₂ and washed with water and brine and dried with Na₂SO₄. Evaporation of the solvent yielded the product as a yellow oil (11,8 g, 37 mmol, 85%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,27 (m, , 5H,), 7,16 (d, J = 8,8 Hz, 2H,) 6,82 (d, J =8.8 Hz, 2H), 3,8 (s, 6H, OMe), 2,27 (s, 2H, NH₂)

Fmoc-Asp(Cl)-OBzl

Fmoc-Asp-OBzl was dissolved in 25 ml CH₂Cl₂. DMF (50 µl) was added and the reaction mixture cooled to 4°C. Oxalylchlorid (0,95 ml, 10,95 mmol) was added at 5°C and the reaction mixture was stirred for 3h. The solvent was removed under reduced pressure. CH₂Cl₂ was added to the residue and evaporated to dryness.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.76 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H4, H5 Fmoc), 7.56 (d, 2H, J = 7.3 Hz, H1, H8 Fmoc), 7.4-7.29 (m, 11H), 5.21 (s, 2H, Benzyl), 4.62 (m, 1H HA), 4.41 (d, J = 6.85 Hz, 2H, H10 Fmoc), 4.21 (tr, J = 6.85 Hz, 1H, H-9), 3.58 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB) 3.50 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB)

Fmoc-Asn(DMT)-OBzl

Compound **1** (1.63 g, 3.65 mmol) was dissolved in 15ml CH_2Cl_2 . A solution of DMT- NH_2 (1.05 g, 3.29 mmol) and TEA (0.95 ml, 3.65 mmol) in CH_2Cl_2 was added. After stirring for 16h the organic phase was washed with $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.1 M, pH 6), brine and dried (Na_2SO_4). Evaporation of the solvent afforded **2** (2.63 g, 3.52 mmol, 94%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.74 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H4, H5 Fmoc), 7.56 (d, J = 7 Hz, 2H H1, H8 Fmoc), 7.38 (m, 2H, H3, H6 Fmoc), 7.30-6.76 (m, 20H), 5.14 (m, 2H, Benzyl), 4.64 (m, 1H, HA), 4.31 (m, 2H H10), 4.17 (tr, J = 7.3 Hz, 1H, H-9), 3.72 (s, 6H, OMe), 3.08 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB) 2.81 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB)

ESI-MS (TMA/ACN, positive mode): $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{TMA}]^+$ calc. 806.38 found 806.29

Fmoc-Asn(DMT)-OH

A solution of 0.75 g (1 mMol) **2** in 30 ml methanol/water (9/1) was hydrogenated over 70 mg 30% Pd/C. After stirring for 18h, the catalyst was removed by filtration. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was recrystallized from ethylacetate / hexane. Drying in vacuo afforded **3** (0.47 g, 0.72 mmol, 72%) as a solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.74 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.56 (d, 2H, J = 6.6 Hz, H-1, H-8 Fmoc), 7.38 (m, 2H, H3, H6 Fmoc), 7.30-6.76 (m, 15H), 4.41 (m, 1H, HA), 4.31 (m, 2H, H10), 4.17 (tr, J = 7.3 Hz, 1H, H-9), 3.72 (s, 6H, OMe), 2.98 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB), 2.80 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ = 172.56, 170.99, 158.52 (2C, DMT), 156.1 (1C, CONH), 144.17, 143.73 (2C, C1A, C8A Fmoc), 143.60, 141.25, 136.21, 129.74 (4C, DMT), 128.41, 128.07, 127.73, 127.23, 127.10, 125.13 (2C, C-1, C-8 Fmoc), 119.96 (2C, C-4, C-5 Fmoc), 113.34 (4C, DMT), 70.70 (1C, C-(Ph)₃), 67.29 (1C, C10 Fmoc), 55.19 (2C, OMe), 50.63 (1C, CA), 47.04 (1C, C-9), 38.85, (1C, CB)

ESI-HRMS (positive mode): $\text{C}_{40}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{NaO}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calc. 679.2417 found 679.24149

Fmoc-Gln(DMT)-OBzl

Fmoc-Glu-OBzl (1.6 g, 3.5 mmol), HATU (1.3 g, 3.5 mmol) and DIEA (1.2 ml, 7 mmol) were preincubated in dichloromethane for 10min. Dimethoxytritylamine (1 g, 3 mmol) dissolved in 10 ml dichloromethane was added and the mixture was stirred for 16 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography (chloroform, 0.5% TEA). After removal of the solvent Fmoc-Gln(DMT)-OBzl **4** (1.4g, 61%) was isolated as a white solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.75 (d, J = 7,6 Hz 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.58 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H-1, H-8 Fmoc), 7.43-6.76 (m, 22H), 5.62 (d, 1H, NH), 5.17 (m, 2H, Benzyl), 4.43 (m, 1H, HA), 4.35 (m, 2H, H10), 4.21 (m, 1H, H9), 3.76 (s, 6H, OMe), 2.24 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB) 1.98 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ = 170.99, 158.33, 145.08, 143.94, 141.32, 137.11, 135.23, 129.74, 128.41, 128.07, 127.73, 127.23, 127.10, 125.18, 119.98, 113.20, 69.91, 67.34 (1C, CH_2Bzl), 67.07 (1C, C10 Fmoc), 55.25 (2C, OMe), 53.68 (1C, CA), 47.22 (1C, C9 Fmoc), 33.36 (1C, $\text{C}\gamma$), 28.29 (1C, CB)

ESI-MS (TMA/ACN, positive mode): $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{TMA}]^+$ calc. 806.38 found 806.29

Fmoc-Gln(DMT)-OH

A solution of 1,4 g (1,8 mmol) **4** in 50 ml methanol/water (9/1) was hydrogenated over 140 mg 30% Pd/C. After stirring for 18 h, the catalyst was removed by filtration. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was recrystallized from ethylacetate / hexane. Drying in vacuo afforded **5** (0,7 g, 1,04 mmol, 58 %) as a solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 7.74 (d, J = 7.1 Hz, 2H, H4, H5 Fmoc), 7.56 (d, 2H, J = 6.6 Hz, H1, H8 Fmoc), 7.38 (m, J = 8 Hz, 2H, H3, H6, Fmoc), 7.30-6.80 (m, 17H), 5.86 (d, 1H, NH), 4.37 (m, 1H, HA), 4.31 (m, 2H), 4.17 (m, 2H), 3.72 (s, 6H, OMe), 2.58 (m, 1H, $\text{H}\gamma$), 2.48 (m, 1H, $\text{H}\gamma$), 2.10 (m, 2H, HB)

ESI-MS (H_2O /ACN, positiver Modus) $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{TEA}]^+$ calc. 862.44 found 862.41

Solid phase synthesis of NVPEPS Peptide

Solid phase synthesis was performed on a ABI-433A peptide synthesizer (Fmoc- chemistry, Rink amide resin) using standard protocols. Peptide A was synthesised with *N*-terminal Fmoc-Asn(DMT)-OH residue and peptide B with *N*-terminal Fmoc-Asn(Trt)-OH residue. Both peptides were cleaved with TFA/TIS/ H_2O (90/5/5) for 1h. The crude peptides were analyzed by RP-HPLC and ESI-MS.

References

1. Houben-Weyl, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 4. Auflage, **2004**
2. Sieber, P.; Riniker, B., Protection of Carboxamide Functions by the Trityl Residue - Application to Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, (6), 739-742.
3. Friede, M.; Denery, S.; Neimark, J.; Kieffer, S.; Gausepohl, H.; Briand, J. P., Incomplete Tfa Deprotection of N-Terminal Trityl-Asparagine Residue in Fmoc Solid-Phase Peptide Chemistry. *Peptide Research* **1992**, 5, (3), 145-147.
4. Quesnel, A.; Briand, J. P., Incomplete trifluoroacetic acid deprotection of asparagine-trityl-protecting group in the vicinity of a reduced peptide bond. *Journal of Peptide Research* **1998**, 52, (2), 107-111.
5. Echner, H.; Voelter, W.; Peptides 1992, Schneider, C. H.; Eberle, A. N., Eds; ESCOM:Leiden, **1993**; p 285.
6. Echner, H.; Voelter, W., Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis and combinatorial Libraries, Epton, R., Ed; Mayflower Scientific Ltd.: Birmingham UK, **1996**, p 353
7. Carpino, L. A.; Chao, H. G.; Ghassemi, S.; Mansour, E. M. E.; Riemer, C.; Warrass, R.; Sadataalae, D.; Truran, G. A.; Imazumi, H.; Elfaham, A.; Ionescu, D.; Ismail, M.; Kowaleski, T. L.; Han, C. H.; Wenschuh, H.; Beyermann, M.; Bienert, M.; Shroff, H.; Albericio, F.; Triolo, S. A.; Sole, N. A.; Kates, S. A., Novel Carboxylic-Acid and Carboxamide Protective Groups Based on the Exceptional Stabilization of the Cyclopropylmethyl Cation. *Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60, (24), 7718-7719.
8. Sax, B.; Dick, F.; Tanner, R.; Gosteli, J., 4-Methyltrityl (Mtt) - a New Protecting Group for the Side-Chain Protection of Asn and Gln in Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Peptide Research* **1992**, 5, (4), 245-246.
9. Smith, M.; Khorana, H. G.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H., Studies on Polynucleotides .14. Specific Synthesis of C3'-C5' Interrribonucleotide Linkage - Syntheses of Uridylyl-(3'-]5')-Uridine and Uridylyl-(3'-]5')-Adenosine. *Journal of the American Chemical Society* **1962**, 84, (3), 430-&.
10. Alves, A. M.; Holland, D.; Edge, M. D., A Chemical Method of Labeling Oligodeoxyribonucleotides with Biotin - a Single Step Procedure Using a Solid-Phase Methodology. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, (23), 3089-3092.
11. Gausepohl, H.; Kraft, M.; Frank, R. W., Asparagine Coupling in Fmoc Solid-Phase Peptide-Synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1989**, 34, (4), 287-294.
12. Dugat, D.; Just, G.; Sahoo, S, *Can. J. Chem* **1987**, 65, 88-93.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

In der Arbeit wurde die Wechselwirkung verschiedener Peptide, welche an die CD4i-Epitope im gp120 binden, untersucht. Hierbei zeigte die aus dem *phage display screening* erhaltene XD3-Sequenz eine schwache Bindung im Bereich von 100 μM , allerdings nicht in Abhängigkeit von sCD4. Aufgrund des Aufbaus des *phage display screenings* ist auch zu erwarten, dass Sequenzen gefunden werden, welche unspezifisch an gp120 binden. Die CD4-Abhängigkeit lässt sich erst in weiteren Tests eindeutig klären. In diesem Fall haben die biologischen Assays bestätigt, dass keine größere Affinität der XD3-Sequenz in Gegenwart von sCD4 vorliegt. Auch wenn neuere Untersuchungen die Wichtigkeit des YD Motivs im CCR5 N-terminus bestätigen [159] ist fraglich, wieviel dieses Motiv wirklich zur Bindung beiträgt. Das ursprünglich als Referenzpeptid angedachte CCR5-Peptid zeigte in den Messungen nur eine schwache Bindung im hohen mikromolaren Bereich. Aufgrund der Tatsache, dass mit nur einer markierten Aminosäure die Wechselwirkung unzureichend charakterisiert werden kann, wurde beschlossen, ein CCR5-Nt-Peptid herzustellen, in welchem ein Großteil der Sequenz ^{15}N -markiert vorliegt. Um die Stabilitätsprobleme mit den Tyrosin-*O*-Sulfat zu umgehen, wurde ein Mimetikum synthetisiert, welches vollkommen stabil unter sauren Bedingungen ist. Allerdings bestätigten die weitergehenden Untersuchungen mit dem siebenfach ^{15}N -markierten modifizierten CCR5-Nt-Peptid, dass nur eine sehr schwache Wechselwirkung im millimolaren Bereich mit dem gp120 vorliegt. Dabei bindet das Peptid nicht an die CD4i-Epitope, da die Zugabe von sCD4 keine Änderung der Affinität hervorgerufen hat. Dies ist in

Übereinstimmung mit den Resultaten einer kürzlich publizierten Thesis [156]. Hierbei zeigte die STD-Untersuchungen eines CCR5-Nt abgeleiteten 17mer Peptides ebenfalls keine Abhängigkeit von sCD4. In ihrer kürzlich erschienen Publikation berichten Rissos et al. Bindungsstudien mit einem CCR5-Nt-Peptid und Peptiden aus dem V3-Loop des gp120. Allerdings sind ihre gemessenen Änderungen in den chemischen Verschiebungen äußerst gering. Auch die Tatsache, dass sie in dem CCR5 Peptid nur bei dem Tyr15 eine Änderung feststellen, wirft die Frage auf, wie signifikant die in der Veröffentlichung diskutierte Wechselwirkung wirklich ist. Ein mögliches Problem könnte z.B. in einer ungünstigen Dissoziationsrate des Komplexes liegen. Mit allen synthetisierten Peptiden war es nicht möglich, die Bindung über ELISAs zu charakterisieren. Dies ist vergleichbar mit Resultaten von Farzan und Cormier. Durch die zahlreichen Waschschrte wird ein nur sehr schwach bindender Ligand entfernt, so dass er nicht detektiert werden kann. Ein weiteres Problem liegt in der Verwendung eines optimalen Proteinsystems. So ist bekannt, dass Resultate unter Verwendung von monomeren gp120 nicht unbedingt auf den nativen trimeren Env Komplex übertragbar sind. Allerdings ist die Herstellung eines löslichen, trimeren Env Komplexes erst seit kurzem möglich. Desweiteren findet man in der Literatur viele Beispiele von Liganden, die eine sehr unterschiedliche Wechselwirkungen mit verschiedenen Env-Stämmen des gleichen Phenotypes eingehen. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der Peptide liegt in der Verwendung multimerer Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang bedeutet multimere Peptidsequenzen, dass mehrere Versionen eines kurzen, linearen Peptides an einen zentralen Träger geknüpft werden. Es finden sich einige Beispiele in der Literatur, dass die Multimerisierung kurzer, linearer Peptide eine deutliche Verbesserung der Inhibitionseigenschaften hervorrufen kann [160]. Außerdem wurde von unserem Kooperationspartner im Georg-Speyer-Haus gezeigt, dass die Multimerisierung des T-20 Peptides und auch des CCR5 N-terminus eine deutliche Steigerung der Inhibitionseigenschaften zur Folge haben [161]. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen sind solche großen, multimeren Peptide allerdings nur bedingt geeignet.

Kapitel 7

Experimenteller Teil

7.1 Material und Methoden

7.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Aminosäuren sowie Reagenzien für den Peptidsynthesizer wurden von Merck Biosciences gekauft. Die ^{15}N markierten Aminosäuren wurden von Euriso-Top GmbH erworben. Vorbeladene Harze wurden von Novabiochem gekauft, während TentaGel S RAM von Rapp Polymere bezogen wurde. Das Piperdin für die Peptidsynthese wurde bei Aldrich gekauft. Wasser wurde mit einer Millipore Anlage gereinigt. Alle Lösungsmittel wurden bei Fluka in p.a. Qualität gekauft und direkt für die Synthese verwendet. Absolute Lösungsmittel stammen von Fluka und wurden über Molsieb gelagert. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero GmbH erworben. Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Fertigfolien von Machery-Nagel (0,2 mm Polygram SIL G/UV₂₅₄) durchgeführt. Für Reaktionen unter Schutzgasatmosphäre wurde Argon verwendet. Das Gas wurde mittels eines Trockenturmes aus P_2O_5 getrocknet.

7.1.2 HPLC-Messungen

Analytische HPLC Chromatogramme wurden entweder auf einer HPLC-Anlage der Fa. Jasco oder auf einem LC-MS-System der Fa. Waters (ZQ 4000 ESI-MS) aufge-

nommen Als Säulenmaterial wurde überwiegend Eurosper RP18, 5 μm , 250x4.6mm benutzt. Als Eluent wurde ein Wasser /Acetonitril Gradient +0,1 % TFA (v/v) (0-100% ACN) bei einer Flussrate von 1ml/min verwendet. Die LC-MS Messungen wurden auf einer Waters Anlage mit einem Micromass ZQ ESI-MS durchgeführt. Bei den Versuchsbeschreibungen wurde die Bruttoretentionszeit t_R und der Acetonitrilanteil im Laufmittel angegeben. Die präparativen Trennungen wurden auf einer Eurospher RP18 Säule (250x8mm, Flussrate 3 ml/min) durchgeführt. Der Erfolg der Trennungen wurde durch Reinjektion der gesammelten Fraktionen auf einer analytischen Säule überprüft. Ein überwiegender Teil der analytischen und präparativen Läufe wurden von Kerstin Overkamp und Gerhard Wolf durchgeführt.

7.1.3 Massenspektren

Die ESI-MS Spektren wurden auf einem Micromass ZQ 4000 von Waters gemessen. Die HR-MS Spektren wurden auf einem APEX-Q III 7T von Bruker gemessen. Die Angaben erfolgen in m/z .

7.1.4 NMR-Spektroskopie an Ligand/Protein Komplexen

Für die Messungen wurde sCD4 von der Firma RD Systems verwendet. Das Protein wurde in lyophilisierter Form geliefert und für die Messungen in H_2O gelöst, portioniert und wieder lyophilisiert. Das gp120 wurde von dem Merck Research Laboratory, Rahway NJ 07065 zur Verfügung gestellt.

7.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration an gelöstem Protein wurde durch Absorptionsmessung bei 280nm (A_{280}) bestimmt.

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad (7.1)$$

A_λ : Absorption bei der Wellenlänge λ

ϵ_λ : molarer Exktinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ

c : Konzentration

d : Schichtdicke der Küvette

7.1.6 Probenvorbereitung

Für die NMR-Messungen wurde das gp120 durch Ultrafiltration über eine Membran (Centricon, 30 kD CutOff) aufkonzentriert und in den benötigten Puffer überführt. Der Centricon wurde dreimal mit je 1,5 ml von dem für die NMR Experimente benötigten Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Anfangskonzentration von dem gp120 durch UV Messung bei 280 nm bestimmt [162]. Das Protein wurde in den Centricon überführt und dreimal mit je 1 ml von dem neuen Puffer gewaschen. Das Endvolumen wurde durch Aufziehen mit einer Pipette abgeschätzt. Dann wurde die Endkonzentration mittels UV Messung bei 280 nm bestimmt. Üblicherweise hat man hierbei einen Verlust von 20%, welcher aufgrund des Centricons verlorengeht. Das sCD4 wurde in 500 μ l H₂O aufgenommen und in verschiedene Portionen aufgeteilt. Anschließend wurde es wieder lyophilisiert. Das Peptid wurde entweder in dem Puffer oder D₂O gelöst. Das Probenvolumen für die NMR beträgt 250 μ l mit einem D₂O Anteil von 7,5 %. Die Proben wurden über einen Teflonschlauch in das Shigemi Röhrchen überführt.

7.1.7 NMR-Spektroskopie

Die Messungen an dem Peptid/Ligand-Komplexen wurden an 900, 800, 700, 600 MHz Bruker Spektrometern durchgeführt. Die verwendeten Pulsprogramme für die tr-CCR Messungen sind im Anhang aufgeführt. Die Spektren wurden mit XWinNMR 3.0 prozessiert. Die Integration der Peaks wurde mit dem Programm FELIX durchgeführt. Für die Zuordnung des CCR5 Peptides wurden DQF-COSY, TOCSY und NOESY Spektren aufgenommen und mit dem Programm SPARKY 3 (T.D Goddard, T. D Kneller, University of California, San Francisco) ausgewertet (s. 151).

Die Syntheseprodukte wurden auf einem Bruker 400 MHz-Ultrashield Spektrometer bei einer Temperatur von 298 K kontrolliert. Die ^1H bzw. ^{13}C chemischen Verschiebungen wurden in ppm relativ zu CDCl_3 (7.26, 77) und DMSO (2.49, 39.7) angegeben. Die Daten wurden folgendermaßen angegeben: chemische Verschiebung, Multiplizität (s = Singulett, d = Duplett, t = Triplett, q = Quartet, dd = Duplett von Dupletts, m = Muliplett), Kopplungskonstante J in Hertz und Integral. Die Zuordnung der Spektren erfolgte über die Aufnahme von 2D-(^{13}C , ^1H) HSQC bzw. 2D-(^{13}C , ^1H) HMBC Experimenten.

7.1.8 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden als KBr-Pressling mit einem FT-IR-Spektrometer PC1000 der Firma Perkin Elmer aufgenommen. Die relativen Intensitäten der Absorptionsbanden wurden mit s = strong, m = medium, w = weak abgekürzt.

7.1.9 Allgemeine Arbeitsvorschrift Fmoc-Schützung

Die Aminosäure wurde in einem Gemisch H_2O /Dioxan vorgelegt. Der pH Wert wurde mit Na_2CO_3 auf pH = 9 eingestellt. Das Fmoc-OSu (1 eq.) wurde in Dioxan gelöst und bei 0°C zugeotropft. Anschließend wurde der Ansatz bei Rt gerührt. Der Ansatz wurde 3x mit Diethylether extrahiert. Die aq. Phase wurde mit HCl angesäuert. Die Fmoc-Aminosäure wurde mit Ethylacetat extrahiert. Die org. Phase wurde mit ges. NaCl gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet.

7.2 Festphasensynthese

7.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift 433A Peptide Synthesizer

Die Synthesen wurden in einem Maßstab von 0,1 mmol durchgeführt. Die verwendete Chemie ist entweder die Standard FmocChemie von Applied Biosystem oder eine modifizierte FmocChemie, in der die Kupplungszeit auf 1h erhöht wurde. Die verwendeten Kartuschen wurden selbst gefüllt.

7.2.2 Allgemeine Arbeitsvorschrift manuelle Peptidsynthese

Die Synthesen wurden in Durchflußreaktoren ausgeführt. Dabei handelte es sich um Polypropylenspritzen, die mit einer Polyethylenfritte (Porengröße 25 μm) versehen sind. Das Volumen beträgt 2 ml, was einen Synthesemaßstab bis 100 μmol erlaubt. Alle Standardamino-säuren wurden in einem Überschuß von 5 eq. mit einem HBTU/DIEA/HOBT Protokoll gekuppelt. Bei den ^{15}N markierten Aminosäuren wurde der Überschuß auf 1,2 eq. reduziert und die Kupplungszeit auf 16 h erhöht. Der generelle Kupplungsablauf ist in Tab. 7.1 beschrieben. Gegebenenfalls wurde eine Aminosäure zweimal hintereinander gekuppelt (Doppelkupplung). Die Kupplungen wurden in DMF durchgeführt. Die Biotinylierung der Peptide erfolgte entweder über direkte Kupplung von Biotin an die *N*-terminale Aminosäure oder durch den Einbau von Fmoc-Lys(Biotin)-OH in die Sequenz. Die Kupplung von Biotin wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit von Biotin in reinem DMF in einer Mischung DMF/DMSO (1:1) durchgeführt [163]. Teilweise wurde nach den Kupplungen ein Acetylierungsschritt mit Ac_2O (Capping) durchgeführt, um nichtumgesetzte Aminogruppen am Harz abzusättigen.

Entschützung	20 Piperidin/DMF	2x 20min
Waschen	DMF	10x *1 min
Kupplung	0,3 M Fmoc-Aminosäure (DMF),HBTU/HOBT	60min
Waschen	DMF	10x 1 min

Tabelle 7.1: Ablauf der manuellen Peptidsynthese

7.2.3 Abspaltungsreaktionen

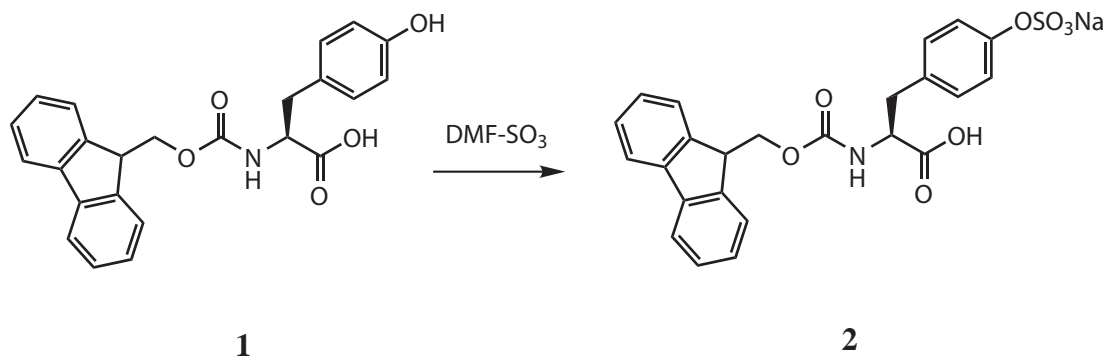
Die Abspaltungsreaktionen wurden in Polypropylenspritzen durchgeführt. Nach jeder Synthese wurde zunächst eine Probeabspaltung von 5-10 mg Harz vorgenommen, um eventuell die Abspaltungsbedingungen zu optimieren. Für die vollständige Abspaltung wurde das Harz in verschiedene Portionen aufgeteilt (200 mg je Spritze) und mit frisch angesetzter Abspalllösung (1 ml pro 100 mg Harz) versetzt. Für die Abspaltungen wurden folgende Lösungen verwendet: 85% TFA, 5% H₂O, 5% TIS, 5% EDT (Abspalllösung A). Nach entsprechender Reaktionszeit wurde das Peptid mit Diethylether ausgefällt und dreimal mit Diethylether gewaschen. Das Rohpeptid wurde in H₂O/ACN gelöst und lyophilisiert.

7.2.4 Abspaltung Tyrosin *O*-sulfatierter Peptide

Das Gemisch aus 90% TFA, 5% H₂O und 5% m-Kresol (Abspalllösung B) wurde im Kühlschrank auf -20°C vorgekühlt. Für die Abspaltung wurde die Spritze mit dem Harz in ein Eisbad gehängt, mit der Abspalllösung versetzt und für die entsprechende Reaktionszeit geschüttelt. Während der Abspaltung wurde die Temperatur des Eisbades durch Zugabe von Eis auf 0°C gehalten.

7.3 Beschreibung der Versuche

Synthese von Fmoc-Tyr(SO₃Na)-OH [108]



Das Fmoc-Tyr-OH **1** (1,59 g, 3,94 mmol) wurde in einer Mischung aus 16 ml DMF, 4 ml Pyridin und 2 ml Dioxan gelöst. Der DMF-SO₃ Komplex (1,84 g, 12 mmol) wurde hinzugegeben und der Ansatz 15 h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit 40 ml H₂O versetzt. Der pH Wert wurde mit einer 5% Na₂CO₃ Lsg innerhalb von 1 h auf pH = 6,5 eingestellt. Der Ansatz wurde lyophilisiert. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen. Das Produkt **2** wurde mit Diethylether ausgefällt und als weißer Feststoff isoliert.

Ausbeute: 2,2 g (94 %)

Rf Wert (CHCl₃/MeOH/AcOH 9/3/0,5): 0,41

¹H-NMR(DMSO): δ = 7.86 (d, J =7.5 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.65 (m, J =8 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.39 (m, J =7 Hz, 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.31 (m, J =7 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.07 (dd, J =7.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.03 (dd, J =7.9 Hz, 2H, H-2', H-6') 6.8 (d, 1H, NH), 4.43 (d, 2H, H-10 Fmoc), 4.2 (tr, 1H, H-9, Fmoc), 3.98 (m, 1H, HA), 3.06 (d, J =4 Hz, 1H, HB), 2.9 (d, J =4 Hz, 1H, HB)

FT-IR (KBr-Pressling): 2933 (w), 1713 (s), 1673 (s), 1506 (m), 1264 (s), 1055 (s), 871 (m), 740 (m)

ESI-MS (MeOH, negativer Modus): C₂₄H₂₀NO₈S [M-Na]⁻ ber. 482.48, gef. 482.16

Synthese von Fmoc-¹⁵NSer-OH

Es wurden 0,5 g (4,7 mmol) ¹⁵N-Ser nach Standardvorschrift Fmoc geschützt. Man erhält 1,92 g (5,8 mmol, 81 %) Fmoc-¹⁵NSer-OH als weißen Feststoff.

¹H-NMR(DMSO, 400 MHz): δ = 7.88 (d, J =7 Hz 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.73 (m, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.41 (m, J =8 Hz 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.36 (m, J =7.9 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.32 (dd, J =8 Hz, J =92 Hz, 1H, $J(NH)$ =92 Hz, NH), 4.28 (m, 2H H-10 Fmoc), 4.22 (tr, J =7,3 Hz, 1H, H-9) 4.04 (m, 1H, HA), 3.65 (m, 2H, HB)

ESI-MS (MeOH, positiver Modus): C₁₈H₁₇¹⁵NO₅ [M+H]⁺ ber. 329.34, gef. 329.11

Synthese von Fmoc-¹⁵NGly-OH

Es wurden 0,25 g (3,27 mmol) ¹⁵N-Gly nach Standardvorschrift Fmoc geschützt. Man erhält 0,9 g (3,01 mmol, 92 %) Fmoc-¹⁵NGly-OH als weißen Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.88 (d, J =7.5 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.69 (m, J =8 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.61 (dtr, J =9 Hz, 1H, $J(NH)$ =92 Hz, NH) 7.45 (m, J =7 Hz 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.31 (m, J =7.9 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 4.28 (m, 2H, H-10 Fmoc), 4.21 (m, 1H, H-9, Fmoc) 3.64 (d, 2H, HA)

ESI-MS (MeOH, positiver Modus): C₁₇H₁₆¹⁵NO₄S [M+H]⁺ ber. 299.31 gef. 299.15

Synthese von Fmoc-¹⁵NIle-OH

Es wurden 0,25 g (1,9 mmol) ¹⁵N-Ile nach Standardvorschrift Fmoc geschützt. Man erhält 0,57 g (1,6 mmol, 85 %) Fmoc-¹⁵NIle-OH als weißen Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.77 (d, J =7.5 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.67 (m, J =8 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.40 (m, J =7 Hz 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.30 (m, J =7.9 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 5.30 (dd, J =9 Hz, J =92 Hz, 1H, $J(NH)$ =92 Hz, NH), 4.43 (d, 2H, H-10), 4.24 (tr, 1H, H-9, Fmoc), 1.49 (m, 1H), 1.23 (m, 1H), 1.06-0.9 (m, 9H)

ESI-MS (MeOH, positiver Modus): C₂₁H₂₄¹⁵NO₄ [M+H]⁺ ber. 355.42 gef. 355.22

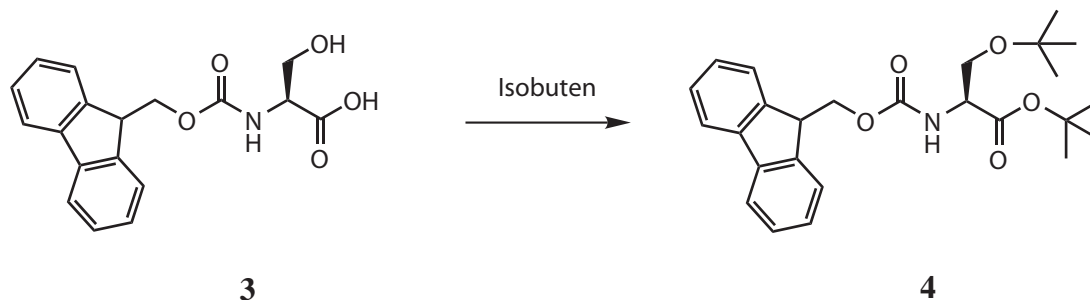
Synthese von Fmoc-¹⁵NTyr-OH

Es wurden 0,5 g (2,7 mmol) ¹⁵N-Tyr nach Standardvorschrift Fmoc geschützt. Man erhält 1,05 g (2,6 mmol, 95 %) Fmoc-¹⁵NTyr-OH als weißen Feststoff.

¹H-NMR(DMSO, 400 MHz): δ = 7.87 (d, J =7.5 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.65 (dd, J =9 Hz, J =92 Hz, 1H, $J(NH)$ =92 Hz, NH), 7.64 (m, J =8 Hz, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.39 (m, J = 7 Hz, 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.29 (m, J =7 Hz 2H, H-2, H-7 Fmoc), 7.04 (dd, J =7.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.64 (dd, J =7.9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.17 (m, 3H, , H-9, H-10 Fmoc), 4.07 (m, 1H, HA), 2.94 (m, 1H, HB), 2.74 (m, 1H, HB)

ESI-MS (MeOH, positiver Modus): C₂₄H₂₂NO₅ [M+H]⁺ ber. 405.44 gef. 405.16

Synthese von Fmoc-Ser(tBu)-OtBu



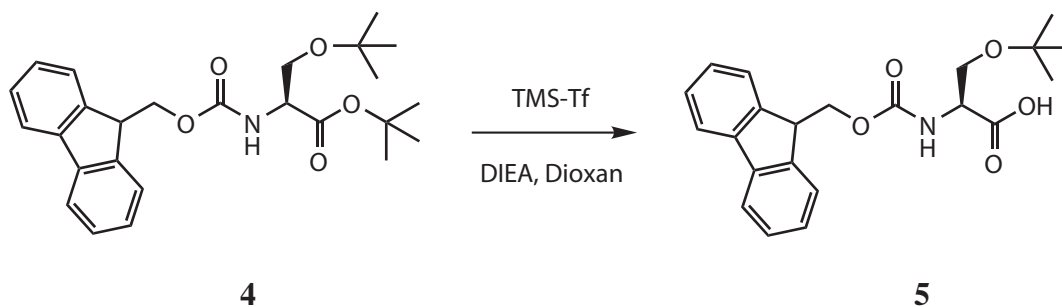
Das Fmoc-¹⁵N-Ser **3** (1,92 g, 5,84 mmol) wurde in einem Glasrohr mit Schraubverschluß vorgelegt. Der Ansatz wurde in 10 ml Dioxan gelöst und mit 400 μ l konz. H₂SO₄ versetzt. Der Ansatz wurde mit flüssigen N₂ gekühlt und 10 ml Isobuten einkondensiert. Das Reaktionsgemisch wurde verschlossen und 72 h bei Rt gerührt. Es wurden 1 ml TEA hinzugegeben und das Isobuten entfernt. Anschließend wurde das Dioxan entfernt. Der Rückstand wurde in CH₂Cl₂ aufgenommen und mit 10 % NaHCO₃ Lsg, ges. NaCl Lsg gewaschen. Das Rohprodukt **4** wurde über Kieselgel (60 g, Essigester/Hexan 1/5, R_f=0,39) gereinigt. Man erhält 1,81 g (4,1 mmol 70%) als weißen Feststoff.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.77 (d, J = 7,5 Hz, 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.63 (m, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.40 (m, J = 8 Hz 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.33 (m, J = 7.9 Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 5.63 (dd, J = 8 Hz, J = 92 Hz, 1H, J (NH) = 92 Hz, NH), 4.39 (m, 3H H-10, HA), 4.26 (tr, J = 7,3 Hz, 1H, H-9) 3.81 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB), 3.58 (dd, J = 8.2 Hz, 1H, HB), 1.49 (s, 9H, C(O)tBu), 1.18 (s, 9H tBu)

¹³C-NMR (CDCl₃, 100.6 MHz): δ = 173.2 (1C, COOH), 156.27 (1C CONH), 143.79, 142.12, 127.72, 127.08, 125.11, 119.99, 82.8 (1C, C(O)O-(CH₃)₃), 74.66 (1C, CO-(CH₃)₃), 66.93 (1C, CB), 60.96 (1C, C-10), 53.10 (1C, CA), 46.60 (1C, C-9), 27.29 (3C, t-Butylester), 26.9 (3C, t-Butylether)

ESI-MS (MeOH, positiver Modus): C₂₆H₃₄NO₅ [M+H]⁺ ber. 441.55 gef. 441.21

Synthese von Fmoc-Ser(tBu)-OH [153]



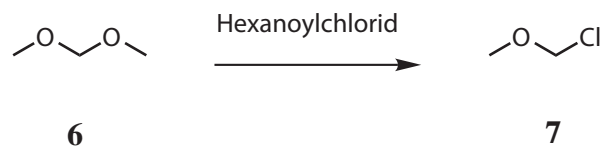
Das ^{15}N Fmoc-Ser(tBu)-OtBu **4** wurde in 50 ml abs. Dioxan unter Argonatmosphäre gelöst. Es wurden 1,07 ml DIEA und 1,47 ml TMS-Triflat hinzugegeben. Der Ansatz wurde 3 h unter Argon refluxiert. Anschließend wurden 30 ml H_2O und 30 ml Essigester hinzugegeben. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde 3x mit ges. NaCl Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Rohprodukt **5** wurde über Kieselgel (60 g, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 20/1, RF: 0,28) gereinigt.

Ausbeute: 0,73 g (1,9 mmol, 46%)

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7.77 (d, $J=7,5$ Hz 2H, H-4, H-5 Fmoc), 7.60 (m, 2H, H-1, H-8 Fmoc), 7.40 (m, $J=8$ Hz 2H, H-3, H-6 Fmoc), 7.34 (m, $J=7,9$ Hz, 2H, H-2, H-7 Fmoc), 5,60 (dd, $J=7,6$ Hz, $J=92$ Hz, 1H, $J(\text{NH})=92$ Hz, NH), 4.43 (m, 3H H10, HA), 4,25 (tr, $J=7,3$ Hz, 1H, H-9) 3.93 (dd, $J=8.2$ Hz, 1H, HB), 3.59 (dd, $J=8.2$ Hz, 1H, HB), 1.22 (s, 9H, tBu)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ = 173.58 (1C, COOH), 156.27 (1C CONH), 143.79, 141.31, 127.72, 127.08, 125.11, 119.99, 74,66 (1C, C-(CH_3)₃), 67.08 (1C, CB), 61.54 (1C, C-10), 53,88, 47.13 (1C, C-9), 27.29 (3c, tBu)

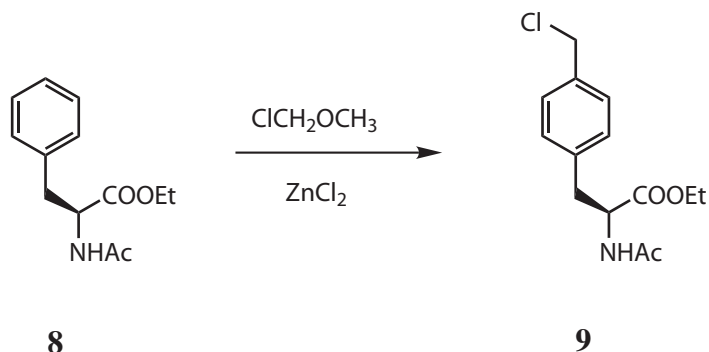
ESI-MS (MeOH, positiver Modus): $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{NO}_5$ ber. 385.45 gef. 385.19

Synthese von (Chlormethyl)methylether [146]

Es wurden 220 ml (2,48 mol) Dimethoxymethan **6** und 350 ml (2,48 mol) Hexanoylchlorid vorgelegt. Es wurden 2 ml Bortrifluoretherat hinzugegeben und der Ansatz bei 60°C für 15 h refluxiert. Der Reaktionsverlauf wurde über die Aufnahme von ^1H -NMR Spektren kontrolliert. Nach dem Reaktionsende wurde der (Chlormethyl)methylether **7** bei 60°C abdestilliert.

Ausbeute: 136,86 g (1,7 mol, 70%)

^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 5.47$ (s, 2H, CH_2) 3.52 (s, 3H, CH_3)

Synthese von Ac-Phe(CH_2Cl)-OEt

In einem ausgeheizten 250 ml Schlenkkolben wurde Verbindung **8** vorgelegt (5 g, 21,25 mmol). Es wurden 8,85 g (64,9 mmol) ZnCl_2 und 50 ml (0,65 mol) (Chlormethyl)methylether hinzugegeben. Der Ansatz wurde 11 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der (Chlormethyl)methylether abdestilliert. Der Rückstand wurde mit ges. NaHCO_3 Lsg. und Diethylether versetzt. Die organische Phase wurde mit NaHCO_3 Lsg. und ges. NaCl Lsg. gewaschen. Das Rohprodukt wurde über Kieselgel (160 g, Hexan/Ethylacetat/MeOH $R_f = 0,3$) chromatographiert. Das Produktgemisch aus *para*- und *ortho* Produkt wurde in Diethylether gelöst und das *p*-Isomer **9** durch Zugabe von Hexan kristallisiert.

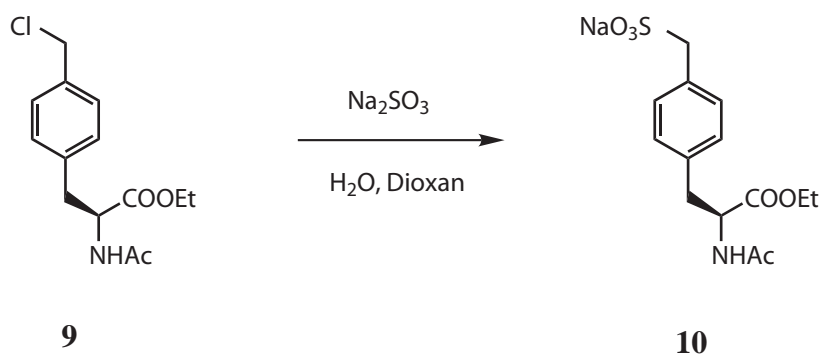
Ausbeute: 2,2 g (7,7 mmol, 36%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7.31 (d, $J=8$ Hz, 2H, H2, H6), 7.10 (d, $J=8$ Hz, 2H, H3, H5), 5.91 (d, $J=7$ Hz 1H, NH), 4.86 (m, $J=7.9$ Hz, 1H, HA), 4.56 (s, 2H, CH_2Cl), 4.18 (q, $J=7$ Hz, 2H CH_2Ester), 3.14 (m, 2H, HB), 2.00 (s, 3H, CH_3), 1.25 (t, $J=7$ Hz, 3H, CH_3 Ester)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100.6 MHz): δ = 171.53 (1C, COOEt), 169.52 (1C, $\text{CO}(\text{NH})$), 136.28 (2C, C-1', C-4'), 129.69 (2C C-3', C-5'), 128.75 (2C, C-2', C-6'), 61.61 (1C, CH_2 Ester), 53.08 (1C, CA) 45.90 (1C, CH_2Cl), 37.62 (1C, CB), 23.16 (1C, COOH), 14.12 (1C, CH_3 Ester)

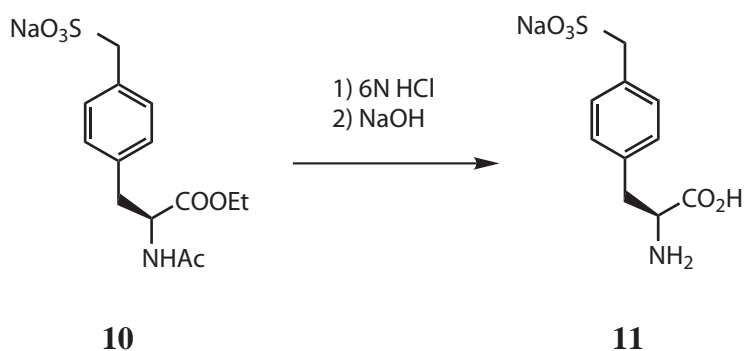
ESI-MS ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, positiver Modus): $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{ClNO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 284,76 gef. 284,07

Synthese von Ac-Phe(CH_2SO_3)-OEt



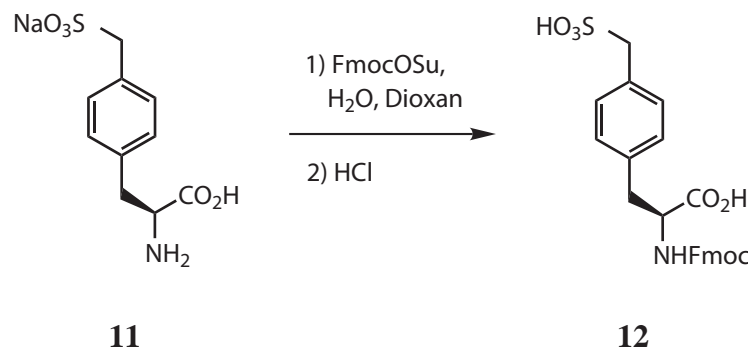
Die Verbindung **9** (1 g, 3,5 mmol) wurde in 100 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{Dioxan}$ (1:1) gelöst. Das Na_2SO_3 (3,1 g, 24,6 mmol) wurde in 30 ml H_2O gelöst und hinzugegeben. Der Ansatz wurde für drei Stunden refluxiert. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische HPLC kontrolliert (RP 18, **9** $t_R=29.06$ min, **10** $t_R=14.43$ min, Gradient: 0-100% ACN in 50 min). Das Reaktionsgemisch wurde direkt für den folgenden Reaktionsschritt verwendet.

ESI-MS ($\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, positiver Modus): $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 330.38 gef. 330.22

Synthese von Phe(CH₂SO₃)-OH

Die Verbindung **10** wurde mit 50 ml 6N HCl versetzt und 4 h unter Rückfluss erhitzt. Der Reaktionsfortschritt wurde durch analytische HPLC kontrolliert (RP 18, **10** t_R = 14.43 min, **11** t_R = 8.37 min, Gradient: 0-100% ACN in 50 min). Der pH Wert wurde mit NaOH auf pH = 7 gebracht. Anschließend wurde der pH Wert mit Na₂CO₃ auf pH = 9 eingestellt. Der Ansatz wurde direkt für die Fmoc-Schützung verwendet.

ESI-MS (ACN/H₂O, positiver Modus): C₁₀H₁₄NO₅S [M+H]⁺ ber. 260,29 gef. 260,15

Synthese von Fmoc-Phe(CH₂SO₃)-OH

Das Reaktionsgemisch **11** wurde mit 50 ml Dioxan versetzt. Es wurden 1.1 eq FmocOSu (1,38 g, 3,85 mmol) in 40 ml Dioxan bei 0°C hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 15h bei Rt gerührt. Eine Reaktionskontrolle mittels HPLC zeigte, dass die Reaktion noch nicht vollständig war (RP 18, **11** t_R = 8.37 min, **12** t_R = 24.9 min, Gradient: 0-100 ACN in 50 min). Es wurden nochmal 1,1 eq FmocOSu hinzugegeben und 42 h bei Rt gerührt. Eine Kontrolle durch analytische HPLC zeigte, dass immer noch Edukt vorhanden war. Es wurden weitere 1,1 eq FmocOSu hinzugegeben und 24 h bei Rt gerührt. HPLC Kontrolle ergab nur noch einen Peak für das Produkt. Der Ansatz wurde auf einen pH Wert pH = 1 gebracht und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Produkt wurde durch Soxhlett Extraktion mit THF isoliert (15h Extraktion). Das THF wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand **12** wurde in 100 ml H₂O aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 1,46 g (3 mmol, 87%)

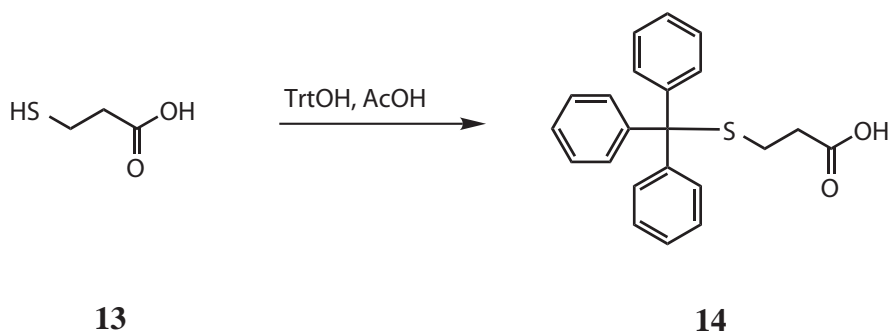
¹H-NMR (DMSO, 400 MHz): δ = 7.86 (d, J = 7,5 Hz, 2H, H-4, H-5), 7.67 (m, J = 8 Hz, 2H, H-1, H-8), 7.40 (m, J = 7 Hz 2H, H-3, H-6), 7.30 (m, J = 7.9 Hz, 2H, H-2, H-7), 7.21 (d, J = 7,8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.15 (d, J = 7,8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 4.17 (m, 4H, H-9, HA, H10), 3.72 (s, 2H, CH₂SO₃), 3.06 (d, J = 4 Hz, 1H HB), 3.01 (d, J = 4 Hz, 1H, HB)

¹³C-NMR (DMSO, 100.6 MHz): δ = 173.58 (1C, COOH), 156.17 (1C, CONH), 144.09 (2C, C-4a, C-5a Fmoc), 140.86 (2C, C1a, C8a Fmoc), 136.14 (1C, C-1'), 133.20 (1C, C-4'), 130.32 (2C C-3', C-5'), 128.52 (2C, C-2', C-6'), 127.82 (2C, C-

3,C-6), 127.27 (2C, C-2,C-7), 125.56 (2C, C-1,C-8), 120.27 (2C, C4,C5), 65.88 (1C, C-10), 57.33 (1C, CH₂SO₃), 55.74 (1C, CA), 46.75 (1C, C-9), 36.25 (1C, CB),

ESI-MS (MeOH,positiver Modus) : C₂₅H₂₄NO₇S [M+H]⁺ ber. 482,12 gef. 482,10

Synthese von 3-Tritylthiopropionsäure [158]



Es wurden 5g (19,2 mmol) Triphenylmethanol und 1,6 ml (18 mmol) 3-Mercaptopropionsäure **13** in 7 ml Eisessig vorgelegt. Der Ansatz wurde auf 75°C erwärmt und 2,6 ml (20 mmol) BF₃*Et₂O hinzugegeben. Es wurde 2h bei Rt gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf H₂O gegeben. Der Rückstand **14** wurde abgesaugt, mit H₂O und Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,35 g (15,4 mmol, 80%)

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 12,20 (s, 1H, COOH), 7.35-7,2 (m, 15H, Trityl), 2,27 (tr, J=7 Hz 2H), 2,15 (tr, J=7 Hz, 2H)

ESI-MS (ACN/H₂O,positiver Modus): C₂₂H₂₀O₂SNa [M+Na]⁺ ber. 371.11 gef. 371.11

7.4 Synthese der Peptide

In den folgenden Tabellen sind die Reaktionsansätze und der Syntheseablauf für die verschiedenen Peptidsynthesen aufgelistet.

7.4.1 Synthese von 12A1



Ansatz: 0,1 mmol (171 mg) Fmoc-Leu-Wang Harz

Die Synthese wurde manuell nach einem DIC/HOBt Kupplungsprotokoll durchgeführt (10 eq Aa, 11 eq DIC, 15 eq HOBt). Nach jeder Kupplung wurde mit Ac_2O /DMF/Pyridin (200 μl , 600 μl , 400 μl) ein Capping-Schritt ausgeführt.

Tabelle 7.2: Synthese von 12A1

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Gly-OH	297 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	DIC/HOBt	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ala-OH	311 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping

Der Ansatz wurde in zwei Portionen aufgeteilt. Das Peptid wurde von dem halben Ansatz (0.05 mmol) bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

ESI-MS (positiver Modus): $\text{C}_{63}\text{H}_{96}\text{N}_{14}\text{O}_{19}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber 1354.53 gef 1354.66

Ausbeute: 18 mg, 13,3 μmol , 27%

7.4.2 Synthese von $[Y(SO_3)^9]$ 12A1

S¹LSSEKLAY(SO₃WGL¹²

Ansatz: 0,1 mmol (171 mg) Fmoc-Leu-Wang Harz

Die Synthese wurde manuell nach einem DIC/HOBt Kupplungsprotokoll durchgeführt (10 eq Aa, 11 eq DIC, 15 eq HOBt). Nach jeder Kupplung wurde mit Ac₂O /DMF/Pyridin (200 μ l, 600 μ l, 400 μ l) ein Capping-Schritt ausgeführt.

Tabelle 7.3: Synthese von $[Y(SO_3)^9]$ 12A1

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Gly-OH	297 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	DIC/HOBt	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ala-OH	311 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping

Der Ansatz wurde in zwei Portionen aufgeteilt. Das Peptid wurde von dem halben Ansatz (0.05 mmol) bei 0°C für 2 h abgespalten (Abspatlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

ESI-MS (negativer Modus): C₆₃H₉₅N₁₄O₂₂S [M-H]⁻ ber 1432.49 gef 1432.56

Ausbeute: 9 mg, 6,3 μ mol, 12%

7.4.3 Synthese von 12A2 Biotin



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc)-Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt.

Tabelle 7.4: **Synthese von 12A2 Biotin**

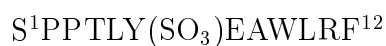
Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Biotin	73 mg	DMF/DMSO	3h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

ESI-MS (positiver Modus): $\text{C}_{81}\text{H}_{130}\text{N}_{23}\text{O}_{23}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber 1825.14 gef 1824.72

Ausbeute: 25 mg, 14 μmol , 14%

7.4.4 Synthese von $[\text{Y}(\text{SO}_3)^6]$ 12A3



Ansatz: 0,1 mmol (100 mg) Fmoc-Phe-Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt.

Tabelle 7.5: Synthese von $[\text{Y}(\text{SO}_3)^6]$ 12A3

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ala-OH	311 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei 0°C für 2 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

ESI-MS (negativer Modus): $\text{C}_{72}\text{H}_{111}\text{N}_{21}\text{O}_{21}\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$ ber 1559.67 gef 1559.05

Ausbeute: 7 mg, 4,5 μmol , 5%

7.4.5 Synthese von XD3



Ansatz: 0,1 mmol (193 mg) Fmoc-Arg(Pmc)-Wang Harz

Die Synthese wurde manuell nach einem DIC/HOBt Kupplungsprotokoll durchgeführt (10 eq Aa, 11 eq DIC, 15 eq HOBt). Nach jeder Kupplung wurde mit Ac_2O /DMF/Pyridin (200 μl , 600 μl , 400 μl) ein Capping-Schritt ausgeführt. Die Kupp-

Tabelle 7.6: **Synthese von XD3**

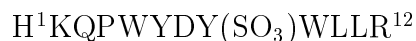
Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	DIC/HOBt	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	DIC/HOBt	2h	Capping

lungen wurden durch Zugabe von Bromphenolblau kontrolliert. Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

ESI-MS (positiver Modus): $\text{C}_{84}\text{H}_{113}\text{N}_{21}\text{O}_{18}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber 1705.95 gef 1705.40

Ausbeute: 72 mg, 42,2 μmol , 42%

7.4.6 Synthese von $[Y(SO_3)^8]$ XD3



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt.

Tabelle 7.7: Synthese von $[Y(SO_3)^8]$ XD3

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	x mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung

Von dem Peptid wurde die Hälfte (112 mg Harz) bei 0°C für 6 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 23 mg, 12,8 μ mol, 25,7%

ESI-MS (H₂O/ACN, negativer Modus) C₈₄H₁₁₃N₂₁O₂₁S [M-H]⁻ ber. 1783.95 gef. 1783.34

7.4.7 Synthese von $[\text{Y}(\text{SO}_3)^6] \text{XD3}$



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt.

Tabelle 7.8: **Synthese von $[\text{Y}(\text{SO}_3)^6] \text{XD3}$**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃ Na)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung

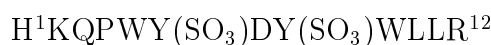
Das Peptid wurde bei 0°C für 6 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 29 mg, 16,2 μmol , 16%

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, negativer Modus) $\text{C}_{84}\text{H}_{113}\text{N}_{21}\text{O}_{21}\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$ ber. 1783.95 gef. 1783.30

7.4.8 Synthese von $[Y(SO_3)^6, Y(SO_3)^8]$ XD3

Sulfatierung am Harz



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc)-Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt. Tyr5 und Tyr7 wurden ohne Seitenkettenschutzgruppe eingebaut. Nach der Synthese wurde das Harz in eine Spritze überführt. Für die Sulfatierung wurden 400 mg DMF-SO₃ Komplex in 2 ml DMF/Pyridin (4/1) gelöst. Das Harz wurde 16h mit der Sulfatierungslösung geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF und CH₂Cl₂ gewaschen.

Tabelle 7.9: **Synthese von $[Y(SO_3)^6, Y(SO_3)^8]$ XD3**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr-OH	402 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Tyr-OH	402 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	1h	
Boc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	1h	

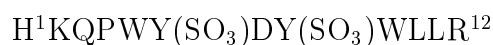
Das Peptid wurde bei 0°C für 6 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 21 mg, 11,4 μ mol, 11%

ESI-MS (H₂O/ACN, negativer Modus) C₈₄H₁₁₃N₂₁O₂₄S₂ [M-H]⁻ ber. 1864.94 gef. 1863.75

7.4.9 Synthese von $[Y(SO_3)^6, Y(SO_3)^8]$ XD3

Einbau $Y(SO_3)$



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc)-Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt. Von dem Harz wurde eine Pro-

Tabelle 7.10: **Synthese von $[Y(SO_3)^6, Y(SO_3)^8]$ XD3**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Trp(tBu)-OH	562mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Tyr(SO ₃ Na)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Tyr(SO ₃ Na)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung

beabsplaltung durchgeführt (Abspaltlösung B), um den Erfolg der Synthese zu kontrollieren. Das restliche Harz wurde aufbewahrt und teilweise für die Synthese des biotinylierten, zweifach sulfatierten XD3 Peptides * markierten XD3 Peptides verwendet.

ESI-MS (H₂O/ACN, negativer Modus) C₈₄H₁₁₃N₂₁O₂₄S₂ [M-H]⁻ ber. 1864.94 gef. 1863.75

*Die Synthese war nicht erfolgreich und ist deshalb nicht mit aufgeführt

7.4.10 Synthese von XD3 Biotin



Ansatz: 0,1 mmol (193 mg) Fmoc-Arg(Pmc)-Wang Harz

Die Synthese der Aminosäuresequenz wurde am Synthesizer durchgeführt. Als *spacer* wurde eine SGSG Sequenz am *N*-terminus eingefügt. Die Biotinylierung erfolgte manuell am *N*-terminus als Doppelkupplung nach einer DIC/HOBt-Aktivierung in DMF/DMSO.

Tabelle 7.11: Synthese von XD3 Biotin

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Biotin	73 mg	DIC/HOBt	3h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 68 mg, 30,6 μmol , 31%

ESI-MS (positiver Modus) $\text{C}_{104}\text{H}_{143}\text{N}_{27}\text{O}_{26}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 2220.53 gef. 2220.7

7.4.11 Synthese von $[Y(SO_3)^8]XD3$ Biotin



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt. Die Biotinylierung erfolgte manuell am *N*-terminus als Doppelkupplung nach einer DIC/HOBt-Aktivierung in DMF/DMSO.

Tabelle 7.12: Synthese von $[Y(SO_3)^8]XD3$ Biotin

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃ Na)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Biotin	73 mg	DIC/HOBt	3h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei 0°C für 6 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 30,7 mg, 13,4 μ mol, 13%

ESI-MS (positiver Modus) C₁₀₄H₁₄₃N₂₇O₂₉S₂ [M+H]⁺ ber. 2300,50 gef. 2299,80

7.4.12 Synthese von $[Y(SO_3)^6]$ XD3 Biotin

Biotin-SGSG-HKQPWY(SO₃)DYWLLR

Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Arg(Pmc) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt. Die Biotinylierung erfolgte manuell am *N*-terminus als Doppelkupplung nach einer DIC/HOBt-Aktivierung in DMF/DMSO.

Tabelle 7.13: Synthese von $[Y(SO_3)^6]$ XD3 Biotin

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung, Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃ Na)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Biotin	73 mg	DIC/HOBt	3h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei 0°C für 6 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 35 mg, 15,4 μ mol, 15%

ESI-MS (positiver Modus) C₁₀₄H₁₄₃N₂₇O₂₉S₂ [M+H]⁺ ber. 2300,50 gef. 2300,61

7.4.13 Synthese von Ac-(¹⁵N, ¹³C)Gly- XD3

¹⁵N,¹³C-Gly-HKQPWY(SO₃)DY(SO₃)WLLR

Ansatz: 0,025 mmol (100 mg) [Tyr(SO₃)⁶,Tyr(SO₃)⁸] XD3 Harz

Die Synthese der doppelt sulfatierten XD3 Sequenz wurde am Synthesizer durchgeführt (s. S.113). Die Einführung von ¹⁵N,¹³C-Gly wurde manuell durchgeführt. Das Peptid wurde bei 0°C für 6 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid

Tabelle 7.14: Synthese von Ac(¹⁵N, ¹³C)Gly-XD3

Reagenz	Einwaage	Lösungsmittel	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-(¹⁵ N, ¹³ C)Gly	22mg,3eq	DMF	3h	DIC/HOBt-Aktivierung
Ac ₂ O	25μl	NMP	45min	keine

wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 9 mg, 4,6 μmol, 19%

ESI-MS (H₂O/ACN, negativer Modus) C₈₄¹³C₂H₁₁₆N₂₁¹⁵NO₁₉S₂ [M-H]⁻ ber. 1966.05
gef. 1965.79

7.4.14 Synthese von $[Y(SO_3)^3, Y(SO_3)^{10}, Y(SO_3)^{14}]$ CCR5 2-18



Ansatz: 0,1 mmol Fmoc-Glu(tBu) Wang (185 mg) Harz

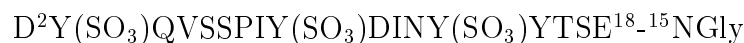
Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt.

Tabelle 7.15: Synthese von $[Y(SO_3)^3, Y(SO_3)^{10}, Y(SO_3)^{14}]$ CCR5 2-18

Reagenz	Einwaage	Lösungsmittel	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	keine

Das Peptid wurde bei 0°C für 6h abgespalten (Abspalllösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 17,8 mg, 7,7 μ mol, 8% ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) bei 2297,15
gef 2296,60

7.4.15 Synthese von CCR5 2-18 ¹⁵NGly

Ansatz: 0,1 mmol (435 mg) TentaGel SRAM Harz

Die Beladung des Harzes mit ¹⁵N-Gly wurde manuell durchgeführt. Anschließend wurde die Synthese der Sequenz 2-18 am Synthesizer durchgeführt. Das Peptid wur-

Tabelle 7.16: Synthese von ¹⁵NGly CCR5 2-18

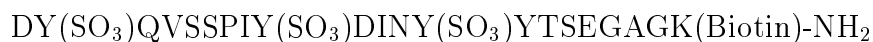
Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc- ¹⁵ NGly-OH	89 mg, 3eq	DIC/HOBt	15 h	manuell
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	HBTU/DIEA	1 h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1 h	Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	1 h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	1 h	Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1 h	Doppelkupplung
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1 h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1 h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	1 h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine

de bei 0°C für 2 h abgespalten (Abspalllösung B). Das Peptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert.

Ausbeute: 14,6 mg, 6,2 μmol, 6%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₉₅H₁₃₂N₁₉¹⁵NO₄₄S₃ [M+H]⁺ ber 2355.2 gef 2355.9

7.4.16 Synthese von CCR5 2-22 Biotin



Ansatz: 0,1 mmol (435 mg) TentaGel SRAM Harz

Die Kupplung von Fmoc-Lys(Biotin) wurde manuell durchgeführt. Anschließend wurde die Synthese des Peptides am Synthesizer fortgesetzt. Das Peptid wurde bei

Tabelle 7.17: **Synthese von CCR5 2-22 Biotin**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Lys(Biotin)	60 mg	HATU/DIEA	15 h	Capping
Fmoc-Gly	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Ala	311 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Gly	297 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	keine

0°C für 2 h abgespalten (Abspaltlösung B). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert..

Ausbeute: 9,7 mg, 3,4 μmol , 3%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₁₁₆H₁₆₈N₂₆O₄₀S [M+H]⁺ ber 2835.85 gef 2834.34

7.4.17 Synthese von CCR5 1-22



Ansatz: 0,1 mmol (164 mg) Rinkamid Harz

Die Synthese wurde am Peptidsynthesizer mit der modifizierten Fmoc-Chemie vorgenommen. Das Peptid wurde bei Rt für 2h abgespalten (Abspalllösung A). Das

Tabelle 7.18: Synthese von CCR5 1-22

Reagenz	Einwaage	Lösungsmittel	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Met-OH	371 mg	HBTU/DIEA	2h	keine

Peptid wurde über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 29.6 mg, 11,2 μmol , 11%

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, positiver Modus) $\text{C}_{117}\text{H}_{171}\text{N}_{27}\text{O}_{40}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 2627.86 gef. 2627.20

7.4.18 Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ CCR5 1-22 Biotin



Ansatz: 0,0 5mmol (217 mg) TentaGel SRAM

Die Kupplung von Fmoc-Lys(Biotin)-OH wurde manuell durchgeführt. Anschließend wurde die Synthese mit dem Synthesizer fortgesetzt. Die Kupplung von Fmoc-Phe(CH₂SO₃)-OH wurde manuell durchgeführt. Das Peptid wurde bei Rt für 2 h

Tabelle 7.19: **Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ CCR5 1-22 Biotin**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Lys(Biotin)-OH	60 mg, 2eq.	HATU/DIEA	15 h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	TFFH/DIEA	2h	manuell
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	TFFH/DIEA	1h	manuell
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	TFFH/DIEA	1h	manuell
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Met-OH	371 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping

abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 4,1 mg, 1,3 μ mol, 3%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₁₃₀H₁₉₁N₂₉O₄₈S [M+H]⁺ ber. 3089.18 gef.

3089.82

7.4.19 Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ CCR5 1-22



Ansatz: 0,05 mmol (217 mg) TentaGel SRAM

Die Sequenz CCR5 15-22 (YTSEPSQK-NH₂) wurde am Synthesizer synthetisiert.

Die restlichen Kupplungen wurden manuell durchgeführt. Nach dem ersten Ein-

Tabelle 7.20: **Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ CCR5 1-22**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	425 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	397 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	HATU/DIEA	6 h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	149 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ile-OH	88 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	103 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	HATU/DIEA	15 h	keine
Fmoc-Ile-OH	88 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Pro-OH	84 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	96 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	96 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Val-OH	85 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	152 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	HATU/DIEA	6 h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	103 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Met-OH	93 mg	DMF	2h	keine

bau von Fmoc-Phe(CH₂SO₃)-OH wurde eine Probeabspaltung (5 mg Harz) durchgeführt, um die Qualität der Synthese zu überprüfen (Abspaltlösung A). Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Ausbeute: 2,2 mg, 0,77 μ mol, 1,5%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₁₂₀H₁₇₇N₂₇O₄₆S [M+H]⁺ ber. 2862.86 gef. 2862.70

7.4.20 Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ markierten CCR5 1-22



Ansatz: 0,05 mmol (217 mg) TentaGel SRAM

Die Synthese wurde manuell durchgeführt.

Tabelle 7.21: Synthese von $[F(CH_2SO_3)^3, F(CH_2SO_3)^{10}, F(CH_2SO_3)^{14}]$ markierten CCR5 1-22

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Lys(Boc)-OH	117 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	152 mg	HBTU/DIEA	1 h	keine
Fmoc- (^{15}N) Ser(tBu)-OH	49 mg	TFFH/DIEA	3 h	keine
Fmoc-Pro-OH	84 mg	HBTU/DIEA	15 h	Capping
Fmoc-Glu(tBu)-OH	106 mg	HBTU/DIEA	1 h	Capping
Fmoc- (^{15}N) Ser(tBu)-OH	49 mg	TFFH/DIEA	3 h	Capping
Fmoc-Thr(tBu)-OH	99 mg	HBTU/DIEA	15 h	keine
Fmoc- (^{15}N) Tyr(tBu)-OH	69 mg	TFFH/DIEA	3 h	keine
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	TFFH/DIEA	2 h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	149 mg	HBTU/DIEA	2 h	keine
Fmoc- (^{15}N) Ile-OH	53 mg	TFFH/DIEA	2 h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	103 mg	HBTU/DIEA	2 h	keine
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	TFFH/DIEA	4 h	keine
Fmoc- (^{15}N) Ile-OH	53 mg	TFFH/DIEA	2 h	keine
Fmoc-Pro-OH	84 mg	HBTU/DIEA	3 h	keine
Fmoc- (^{15}N) Ser(tBu)-OH	49 mg	TFFH/DIEA	3 h	keine
Fmoc- (^{15}N) Ser(tBu)-OH	49 mg	TFFH/DIEA	3 h	keine
Fmoc-Val-OH	85 mg	HBTU/DIEA	3 h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	152 mg	HBTU/DIEA	3 h	keine
Fmoc-Phe(CH ₂ SO ₃)-OH	72 mg	TFFH/DIEA	6 h	keine
Fmoc-Asp(tBu)-OH	103 mg	HBTU/DIEA	3 h	keine
Fmoc-Met-OH	93 mg	HBTU/DIEA	3 h	keine

Nach dem Einbau von Pro⁸ wurde eine Probeabspaltung durchgeführt um die Qualität der Synthese zu kontrollieren (Abspaltlösung A). Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 5,3 mg, 1,8 μ mol, 4%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₁₂₀H₁₇₇N₂₀¹⁵N₇O₄₆S [M+H]⁺ ber. 2869.86
gef. 2870.03

7.4.21 Synthese von 3A9



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Cys(Trt) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt. Das Peptid wurde bei Rt für

Tabelle 7.22: Synthese von 3A9

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe-OH	387 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ala-OH	311 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung

2 h abgespalten (Abspalllösung A). Das lyophilisierte Rohpeptid wurde in einem Wasser/DMSO Gemisch (20% DMSO) aufgenommen und über Nacht geschüttelt. Der Ansatz wurde lyophilisiert, mit Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Das oxidierte Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Ausbeute: 11,5 mg, 9,6 μmol , 10%

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, positiver Modus) $\text{C}_{51}\text{H}_{69}\text{N}_{13}\text{O}_{17}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 1201.33 gef. 1201.84

7.4.22 Synthese von $[Y(SO_3)^5]$ 3A9



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Cys(Trt) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt. Das Peptid wurde bei 0°C für 5 h

Tabelle 7.23: **Synthese von $[Y(SO_3)^5]$ 3A9**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe-OH	387 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Tyr(SO ₃)-OH	504 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Ala-OH	311 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	1h	
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	1h	

abgespalten (Abspaltlösung B). Es wird eine Oxidationslösung aus TFA/CH₂Cl₂/Anisol(82/15/3) und 1.2 eq Thallium(III)trifluoroacetat angesetzt und auf 0°C vorgekühlt. Das lyophilisierte Rohpeptid wurde in der Oxidationslösung aufgenommen (4mg/ml) und für 5h bei 0°C geschüttelt. Die TFA wurde entfernt und der Ansatz mit kaltem Diethylether versetzt. Das ausgefallene Peptid wurde zweimal mit Diethylether gewaschen. Das oxidierte Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Die getrennten Fraktionen wurden mit DIEA neutralisiert und lyophilisiert. Ausbeute: 1,1 mg, 0,86 μ mol, 1%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₅₁H₆₉N₁₃O₂₀S₃ [M+H]⁺ ber. 1280.29 gef. 1280.15

7.4.23 Synthese von 3A9 Biotin



Ansatz: 0,05 mmol (96 mg) Fmoc-Cys(Trt) Wang Harz

Die Synthese der Sequenz 1-12 wurde am Synthesizer durchgeführt. Der SGSG Spacer wurde manuell gekuppelt (10eq Aminosäure, DIC/HOBt). Die Biotinylierung erfolgte ebenfalls manuell (3eq, DIC/HOBt) über Nacht. Das Peptid wurde

Tabelle 7.24: **Synthese von 3A9 Biotin**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Phe-OH	387 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ile-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ala-OH	311 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Biotin	36 mg	DIC/DIEA	3h	

bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Der halbe Ansatz (0,025 mmol) lyophilisierte Rohpeptid wurde in einem Wasser/DMSO Gemisch (20% DMSO) aufgenommen und über Nacht geschüttelt. Der Ansatz wurde lyophilisiert, mit Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Das oxidierte Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 7,1 mg, 4,1 μmol , 16%

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, positiver Modus) $\text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{N}_{19}\text{O}_{25}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 1715.91 gef. 1715.81

7.4.24 Synthese von 5C7



Ansatz: 0,1 mmol (185 mg) Fmoc-Cys(Trt) Wang Harz

Die Synthese wurde am Synthesizer durchgeführt.

Tabelle 7.25: **Synthese von 5C7**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Cys(Trt)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Der halbe Ansatz (0.05 mmol) an lyophilisiertem Rohpeptid wurde in einem Wasser/DMSO Gemisch (20% DMSO) aufgenommen und über Nacht geschüttelt. Der Ansatz wurde lyophilisiert, mit Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Das oxidierte Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt. Ausbeute: 5,8 mg, 4,15 μmol , 8%

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, positiver Modus) $\text{C}_{61}\text{H}_{96}\text{N}_{20}\text{O}_{19}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 1396.69 gef. 1397.50

7.4.25 Synthese von 5C7 Biotin



Ansatz: 0,05 mmol (93 mg) Fmoc-Cys(Trt) Wang Harz

Die Synthese der Sequenz 1-12 wurde am Synthesizer durchgeführt. Der SGSG Spacer wurde manuell gekuppelt (DIC/HOBt). Die Biotinylierung erfolgte ebenfalls manuell (3eq, DIC/HOBt) über Nacht. Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespal-

Tabelle 7.26: Synthese von 5C7 Biotin

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Asp(tBu)-OH	411 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Trp(Boc)-OH	526 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	Capping
Fmoc-Pro-OH	337 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Cys(Trt)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Gly-OH	297 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	DIC/HOBt	2h	Capping
Biotin	73 mg	DIC/HOBt	14h	

ten (Abspaltlösung A). Das lyophilisierte Rohpeptid wurde in einem Wasser/DMSO Gemisch (20% DMSO) aufgenommen und über Nacht geschüttelt. Der Ansatz wurde lyophilisiert, mit Wasser aufgenommen und erneut lyophilisiert. Das oxidierte Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

Ausbeute: 11,3 mg, 6 μmol , 12%

ESI-MS ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$, positiver Modus) $\text{C}_{81}\text{H}_{127}\text{N}_{26}\text{O}_{23}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ ber. 1910.27 gef. 1910.63

7.4.26 Synthese von CD4M33

Tpa-NLHFCQLRCKSLGLLGKCAGSFCACV

Ansatz: 0,05 mmol (217 mg) TentaGel SRAM

Die Sequenz 2-33 (NLHFCQLRCKSLGLLGKCAGSFCACV) wurde am Synthesizer mit der modifizierten Fmoc-Chemie synthetisiert. Die Kupplung der Thiopropionsäure wurde manuell durchgeführt.

Tabelle 7.27: **Synthese von CD4M33**

Reagenz	Einwaage	Aktivierung	Zeit	Bemerkungen
Fmoc-Val-OH	339 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ala-OH	311 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	1h	Doppelkupplung
Fmoc-Phe-OH	387 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Ala-OH	311 mg	HBTU/DIEA	1h	Capping
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	6 h	Doppelkupplung
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	15 h	keine
Fmoc-Gly-OH	297 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Ser(tBu)-OH	383 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Arg(Pmc)-OH	662 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HATU/DIEA	6 h	keine
Fmoc-Gln(Trt)-OH	610 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Cys(Trt)-OH	585 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung
Fmoc-Phe-OH	387 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-His(Trt)-OH	619 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Leu-OH	353 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Asn(Trt)-OH	596 mg	HBTU/DIEA	2h	keine
Fmoc-Tpa(Trt)-OH	87 mg	HBTU/DIEA	2h	Doppelkupplung

Das Peptid wurde bei Rt für 2 h abgespalten (Abspaltlösung A). Das Rohpeptid wurde über HPLC gereinigt.

Die getrennten Fraktionen wurden in zwei Portionen mit je 10ml aufgeteilt. Diese wurden jeweils mit 4ml ACN und 10ml Cystein/Cystin Puffer (pH =8) versetzt. Anschließend wurden die Fraktionen leicht geschüttelt, wobei der Abschluß der Oxidation über MS kontrolliert wurde. Danach wurden die Fraktionen lyophilisiert und über HPLC getrennt. Ausbeute: 6 mg, 2 μ mol, 4%

ESI-MS (H₂O/ACN, positiver Modus) C₁₂₂H₂₀₄N₃₆O₃₁S₆ [M+H]⁺ ber. 2857.45 gef. 2855.64

7.5 Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden anhand der IUPAC Empfehlungen für Biochemische Nomenklatur bezeichnet.

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

Desweiteren wurden folgende Abkürzungen verwendet:

A

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AcOH	Essigsäure
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumpersulfat

B

Bzl	Benzyl
Boc	tert-Butyloxycarbonyl

C

CCK	Cholecystokinin
CCR	kreuz-korrelierte Relaxation
COSY	Correlation Spectroscopy
CSA	Chemical shift anisotropie

D

DAD	Dioden Array Detector
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	Di-isopropyl-carbodiimid
DIEA	Di-isopropyl-ethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

E

EDT	1,2-Ethandithiol
ESI	Elektronensprayionisation
ELISA	enzym linked immunosorbent assay
Env	virales Hüllprotein

F

FIV	feline Immundefizienz Virus
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl

G

gp120	Glycoprotein 120kDa
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

H

h	Stunden
HAART	highly active antiretroviral therapy
HATU	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyuronium-hexafluorophosphat

HIV	Human immunodeficiency virus
Hmb	4-Hydroxymethylbenzoesäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum correlation
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Hz	Hertz

K

kD	Kilodalton
----	------------

M

mAb	monoklonaler Antikörper
MeOH	Methanol
min	Minuten
MLV	murine leukaemia virus

N

NMR	nuclear magnetic resonance
NMP	N-Methylpyrrolidon
NOESY	nuclear overhauser enhanced spectroscopy

O

OD	Optische Dichte
----	-----------------

P

PS	Polystyrol
PBS	phosphat buffer saline
PEG	Polyethylenglycol
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl

R

RF	Ratio of fronts
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur

S

sCD4	soluble CD4
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
SU	Oberflächenglycoprotein
STD	saturation transfer difference

T

T ₁	longitudinale Relaxationszeit
T ₂	transversale Relaxationszeit
tBu	tert-Butyl
t _R	Retentionszeit
TEA	Triethylamin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TentaGel SRAM	Polystyrol/Polyethylen Copolymer mit Rink-Amid Linker
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
TFFH	Fluoro-N,N,N',N'-tetramethylformamidinium-hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TM	Transmembranglycoprotein
TMS	Trimethylsilan
TOCSY	Total correlation spectroscopy
Trt	Triphenylmethyl
Tpa	Thiopropionsäure

Literaturverzeichnis

- [1] M. S. Gottlieb, R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, A. Saxon, *New England Journal of Medicine* **1981**, *305*, 1425–1431
- [2] H. Masur, M. A. Michelis, J. B. Greene, I. Onorato, R. A. Vandestouwe, R. S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H. W. Murray, S. Cunninghamrundles, *New England Journal of Medicine* **1981**, *305*, 1431–1438
- [3] R. C. Gallo, P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robertguroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zollapazner, J. Leibowitch, M. Popovic, *Science* **1983**, *220*, 865–867
- [4] F. Barresinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Daguuet, C. Axlerblin, F. Vezinetbrun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, L. Montagnier, *Science* **1983**, *220*, 868–871
- [5] F. Clavel, D. Guetard, F. Brunvezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santosferreira, A. G. Laurent, C. Daguuet, C. Katlama, C. Rouzioux, D. Klatzmann, J. L. Champalimaud, L. Montagnier, *Science* **1986**, *233*, 343–346
- [6] F. J. Palella, K. M. Delaney, A. C. Moorman, M. O. Loveless, J. Fuhrer, G. A. Satten, D. J. Aschman, S. D. Holmberg, H. O. S. a. Investigators, *New England Journal of Medicine* **1998**, *338*, 853–860
- [7] S. Vella, L. Palmisano, *Antiviral Research* **2000**, *45*, 1–7
- [8] P. Zhu, E. Chertova, J. Bess, J. D. Lifson, L. O. Arthur, J. Liu, K. A. Taylor, K. H. Roux, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 15812–15817

- [9] R. Wyatt, J. Sodroski, *Science* **1998**, *280*, 1884–1888
- [10] C. D. Weiss, J. A. Levy, J. M. White, *Journal of Virology* **1990**, *64*, 5674–5677
- [11] S. A. Gallo, C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell, R. Blumenthal, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2003**, *1614*, 36–50
- [12] A. G. Dalgleish, P. C. L. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, R. A. Weiss, *Nature* **1984**, *312*, 763–767
- [13] D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruet, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, L. Montagnier, *Nature* **1984**, *312*, 767–768
- [14] P. J. Maddon, D. R. Littman, M. Godfrey, D. E. Maddon, L. Chess, R. Axel, *Cell* **1985**, *42*, 93–104
- [15] D. G. Myszka, R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, M. L. Doyle, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 9026–9031
- [16] H. K. Deng, R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. DiMarzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, N. R. Landau, *Nature* **1996**, *381*, 661–666
- [17] B. J. Doranz, J. Rucker, Y. J. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, R. W. Doms, *Cell* **1996**, *85*, 1149–1158
- [18] T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. X. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, W. A. Paxton, *Nature* **1996**, *381*, 667–673
- [19] G. Alkhatib, C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, E. A. Berger, *Science* **1996**, *272*, 1955–1958
- [20] Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy, E. A. Berger, *Science* **1996**, *272*, 872–877

- [21] M. Oppermann, *Cellular Signalling* **2004**, *16*, 1201–1210
- [22] E. Coakley, C. J. Petropoulos, J. M. Whitcomb, *Current Opinion in Infectious Diseases* **2005**, *18*, 9–15
- [23] R. Liu, W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, N. R. Landau, *Cell* **1996**, *86*, 367–377
- [24] O. Hartley, P. J. Klasse, Q. J. Sattentau, J. P. Moore, *Aids Research and Human Retroviruses* **2005**, *21*, 171–189
- [25] G. Pollakis, S. Kang, A. Kliphuis, M. I. M. Chalaby, J. Goudsmit, W. A. Paxton, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 13433–13441
- [26] T. G. Edwards, T. L. Hoffman, F. Baribaud, S. Wyss, C. C. LaBranche, J. Romano, J. Adkinson, M. Sharron, J. A. Hoxie, R. W. Doms, *Journal of Virology* **2001**, *75*, 5230–5239
- [27] S. E. Kuhmann, E. J. Platt, S. L. Kozak, D. Kabat, *Journal of Virology* **2000**, *74*, 7005–7015
- [28] X. H. Wang, R. Staudinger, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *307*, 1066–1069
- [29] E. A. Berger, P. M. Murphy, J. M. Farber, *Annual Review of Immunology* **1999**, *17*, 657–700
- [30] M. Zaitseva, K. Peden, H. Golding, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **2003**, *1614*, 51–61
- [31] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, *393*, 648–659
- [32] P. D. Kwong, R. Wyatt, S. Majeed, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Structure* **2000**, *8*, 1329–1339
- [33] C. C. Huang, F. Stricher, L. Martin, J. M. Decker, S. Majeed, P. Barthe, W. A. Hendrickson, J. Robinson, C. Roumestand, J. Sodroski, R. Wyatt, G. M. Shaw, C. Vita, P. D. Kwong, *Structure* **2005**, *13*, 755–768

- [34] E. Drakopoulou, J. Vizzavona, C. Vita, *Letters in Peptide Science* **1998**, *5*, 241–245
- [35] W. T. Zhang, G. Canziani, C. Plugariu, R. Wyatt, J. Sodroski, R. Sweet, P. Kwong, W. Hendrickson, L. Chaiken, *Biochemistry* **1999**, *38*, 9405–9416
- [36] L. Martin, P. Barthe, O. Combes, C. Roumestand, C. Vita, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9451–9460
- [37] L. Martin, F. Stricher, D. Misse, F. Sironi, M. Pugniere, P. Barthe, R. Prado-Gotor, I. Freulon, X. Magne, C. Roumestand, A. Menez, P. Lusso, F. Veas, C. Vita, *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 71–76
- [38] B. Chen, E. M. Vogan, H. Y. Gong, J. J. Skehel, D. C. Wiley, S. C. Harrison, *Nature* **2005**, *433*, 834–841
- [39] R. Pantophlet, D. R. Burton, *Annual Review of Immunology* **2006**, *24*, 739–769
- [40] C. C. Huang, M. Tang, M. Y. Zhang, S. Majeed, E. Montabana, R. L. Stanfield, D. S. Dimitrov, B. Korber, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt, P. D. Kwong, *Science* **2005**, *310*, 1025–1028
- [41] M. Sharon, N. Kessler, R. Levy, S. Zolla-Pazner, M. Gorlach, J. Anglister, *Structure* **2003**, *11*, 225–236
- [42] O. Rosen, M. Sharon, S. R. Quadt-Akabayov, J. Anglister, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 13950–13955
- [43] B. Meyer, *22nd International conference on magnetic resonance in biological systems (ICMRBS)*, Göttingen
- [44] R. Koradi, M. Billeter, K. Wuthrich, *Journal of Molecular Graphics* **1996**, *14*, 51
- [45] R. G. Efremov, F. Legret, G. Vergoten, A. Capron, G. M. Bahr, A. S. Arseniev, *Journal of Biomolecular Structure Dynamics* **1998**, *16*, 77–90

- [46] S. Q. Liu, S. X. Fan, Z. R. Sun, *Journal of Molecular Modeling* **2003**, *9*, 329–336
- [47] M. G. Paterlini, *Biophysical Journal* **2002**, *83*, 3012–3031
- [48] N. M. Zhou, Z. W. Luo, J. W. Hall, J. S. Luo, X. B. Han, Z. W. Huang, *European Journal of Immunology* **2000**, *30*, 164–173
- [49] K. B. Napier, Z. X. Wang, S. C. Peiper, J. O. Trent, *Journal of Molecular Modeling* **2007**, *13*, 29–41
- [50] A. Fano, D. W. Ritchie, A. Carrieri, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2006**, *46*, 1223–1235
- [51] N. G. Abdulaev, T. T. Strassmaier, T. Ngo, R. W. Chen, H. Luecke, D. D. Oprian, K. D. Ridge, *Structure* **2002**, *10*, 515–525
- [52] C. M. Hill, D. Kwon, M. Jones, C. B. Davis, S. Marmon, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, M. S. Springer, D. Unutmaz, D. R. Littman, *Virology* **1998**, *248*, 357–371
- [53] M. Farzan, T. Mirzabekov, P. Kolchinsky, R. Wyatt, M. Cayabyab, N. P. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, H. Choe, *Cell* **1999**, *96*, 667–676
- [54] C. Blanpain, B. J. Doranz, J. Vakili, J. Rucker, C. Govaerts, S. S. W. Baik, O. Lorthioir, I. Migeotte, F. Libert, F. Baleux, G. Vassart, R. W. Doms, M. Parmentier, *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 34719–34727
- [55] M. Farzan, H. Choe, L. Vaca, K. Martin, Y. Sun, E. Desjardins, N. Ruffing, L. J. Wu, R. Wyatt, N. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, *Journal of Virology* **1998**, *72*, 1160–1164
- [56] G. Rabut, J. A. Konner, T. Dragic, *Journal of Investigative Medicine* **1998**, *46*, 142a–142a
- [57] G. E. E. Rabut, J. A. Konner, F. Kajumo, J. P. Moore, T. Dragic, *Journal of Virology* **1998**, *72*, 3464–3468

- [58] M. Farzan, S. Chung, W. H. Li, N. Vasilieva, P. L. Wright, C. E. Schnitzler, R. J. Marchione, C. Gerard, N. P. Gerard, J. Sodroski, H. Choe, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 40397–40402
- [59] E. G. Cormier, M. Persuh, D. A. D. Thompson, S. W. Lin, T. P. Sakmar, W. C. Olson, T. Dragic, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97*, 5762–5767
- [60] H. Choe, W. H. Li, P. L. Wright, N. Vasilieva, M. Venturi, C. C. Huang, C. Grundner, T. Dorfman, M. B. Zwick, L. P. Wang, E. S. Rosenberg, P. D. Kwong, D. R. Burton, J. E. Robinson, J. G. Sodroski, M. Farzan, *Cell* **2003**, *114*, 161–170
- [61] C. C. Huang, M. Venturi, S. Majeed, M. J. Moore, S. Phogat, M. Y. Zhang, D. S. Dimitrov, W. A. Hendrickson, J. Robinson, J. Sodroski, R. Wyatt, H. Choe, M. Farzan, P. D. Kwong, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 2706–2711
- [62] A. de Parseval, M. D. Bobardt, A. Chatterji, U. Chatterji, J. H. Elder, G. David, S. Zolla-Pazner, M. Farzan, T. H. Lee, P. A. Gallay, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 39493–39504
- [63] L. Agrawal, Z. VanHorn-Ali, E. A. Berger, G. Alkhatib, *Blood* **2004**, *103*, 1211–1217
- [64] K. Sadler, J. P. Tam, *Drug Development Research* **2004**, *62*, 336–348
- [65] K. Ikeda, Y. Ishii, K. Konishi, M. Sato, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **2004**, *52*, 1479–1482
- [66] K. Konishi, K. Ikeda, K. Achiwa, H. Hoshino, K. Tanaka, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **2000**, *48*, 308–309
- [67] P. D. Kwong, R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Journal of Virology* **2000**, *74*, 1961–1972
- [68] C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. Mcdanal, T. J. Matthews, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 9770–9774

- [69] R. A. Furuta, C. T. Wild, Y. K. Weng, C. D. Weiss, *Nature Structural Biology* **1998**, *5*, 276–279
- [70] Y. Kliger, Y. Shai, *Journal of Molecular Biology* **2000**, *295*, 163–168
- [71] S. W. Liu, H. Lu, J. Niu, Y. J. Xu, S. G. Wu, S. B. Jiang, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 11259–11273
- [72] W. Yuan, S. Craig, Z. H. Si, M. Farzan, J. Sodroski, *Journal of Virology* **2004**, *78*, 5448–5457
- [73] H. J. P. Ryser, R. Fluckiger, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1085–1094
- [74] Y. R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi, D. R. Littman, *Nature* **1998**, *393*, 595–599
- [75] A. Trkola, T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. ChengMayer, J. Robinson, P. J. Maddon, J. P. Moore, *Nature* **1996**, *384*, 184–187
- [76] L. J. Wu, N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, J. Sodroski, *Nature* **1996**, *384*, 179–183
- [77] S. H. Xiang, N. Doka, R. K. Choudhary, J. Sodroski, J. E. Robinson, *Aids Research and Human Retroviruses* **2002**, *18*, 1207–1217
- [78] M. Thali, J. P. Moore, C. Furman, M. Charles, D. D. Ho, J. Robinson, J. Sodroski, *Journal of Virology* **1993**, *67*, 3978–3988
- [79] A. F. Labrijn, P. Poignard, A. Raja, M. B. Zwick, K. Delgado, M. Franti, J. Binley, V. Vivona, C. Grundner, C. C. Huang, M. Venturi, C. J. Petropoulos, T. Wrin, D. S. Dimitrov, J. Robinson, P. D. Kwong, R. T. Wyatt, J. Sodroski, D. R. Burton, *Journal of Virology* **2003**, *77*, 10557–10565
- [80] B. Dey, C. S. Del Castillo, E. A. Berger, *Journal of Virology* **2003**, *77*, 2859–2865
- [81] R. B. Merrifield, *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 2149–

- [82] A. Ganesan, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 3–10
- [83] B. Blankemeyermenge, R. Frank, *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 5871–5874
- [84] M. Beyermann, M. Bienert, H. Niedrich, L. A. Carpino, D. Sadataalae, *Journal of Organic Chemistry* **1990**, *55*, 721–728
- [85] M. Mizuno, K. Goto, T. Miura, T. Matsuura, T. Inazu, *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 3425–3428
- [86] W. S. Miao, T. H. Chan, *Journal of Organic Chemistry* **2005**, *70*, 3251–3255
- [87] L. A. Carpino, *Journal of the American Chemical Society* **1957**, *79*, 98–101
- [88] L. A. Carpino, G. Y. Han, *Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37*, 3404–
- [89] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1978**, 537–539, fg170 Times Cited:190 Cited References Count:17
- [90] C. D. Chang, J. Meienhofer, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1978**, *11*, 246–249, ey476 Times Cited:232 Cited References Count:35
- [91] S. Y. Han, Y. A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447–2467
- [92] Y. X. Han, F. Albericio, G. Barany, *Journal of Organic Chemistry* **1997**, *62*, 4307–4312
- [93] M. Goodman (Editor), *Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, volume E 22a of *Houben-Weyl*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2004**
- [94] L. A. Carpino, A. Elfaham, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 5401–5402
- [95] C. Kay, O. E. Lorthioir, N. J. Parr, M. Congreve, S. C. McKeown, J. J. Sci-cinski, S. V. Ley, *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, *71*, 110–118
- [96] V. Krchnak, J. Vagner, M. Lebl, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1988**, *32*, 415–416

- [97] E. Kaiser, Colescot.Rl, Bossinge.Cd, P. I. Cook, *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595–
- [98] M. Mergler, F. Dick, *Journal of Peptide Science* **2005**, *11*, 650–657
- [99] F. R. Bettelheim, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 2838–2839
- [100] R. W. H. Lee, W. B. Huttner, *Journal of Biological Chemistry* **1983**, *258*, 1326–1334
- [101] Y. B. Ouyang, W. S. Lane, K. L. Moore, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 2896–2901
- [102] K. L. Moore, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 24243–24246
- [103] J. L. Kice, J. M. Anderson, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 5242–
- [104] T. Young, L. L. Kiessling, *Angewandte Chemie-International Edition* **2002**, *41*, 3449–3451
- [105] S. Futaki, T. Taike, T. Yagami, T. Ogawa, T. Akita, K. Kitagawa, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1990**, 1739–1744
- [106] C. Seibert, M. Cadene, A. Sanfiz, B. T. Chait, T. P. Sakmar, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 11031–11036
- [107] C. T. Veldkamp, C. Seibert, F. C. Peterson, T. P. Sakmar, B. F. Volkman, *Journal of Molecular Biology* **2006**, *359*, 1400–1409
- [108] T. Yagami, S. Shiwa, S. Futaki, K. Kitagawa, *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **1993**, *41*, 376–380
- [109] K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, T. Yagami, S. Futaki, M. Kogire, J. Ida, K. Inoue, *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 1–10
- [110] T. Yagami, K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, S. Futaki, *Journal of Peptide Research* **2000**, *56*, 239–249

- [111] S. V. Campos, L. P. Miranda, M. Meldal, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **2002**, 682–686
- [112] T. Carlomagno, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2005**, *34*, 245–266
- [113] S. Ravindranathan, J. M. Mallet, P. Sinay, G. Bodenhausen, *Journal of Magnetic Resonance* **2003**, *163*, 199–207
- [114] B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, *Science* **1997**, *276*, 1230–1233
- [115] C. H. Wu, A. Ramamoorthy, L. M. Gierasch, S. J. Opella, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 6148–6149
- [116] J. Boyd, C. Redfield, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 9692–9693
- [117] J. R. Brender, D. M. Taylor, A. Ramamoorthy, *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 914–922
- [118] G. Lipari, A. Szabo, *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*, 4546–4559
- [119] I. C. Felli, C. Richter, C. Griesinger, H. Schwalbe, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1956–1957
- [120] A. Bax, G. W. Vuister, S. Grzesiek, F. Delaglio, A. C. Wang, R. Tschudin, G. Zhu, *Nuclear Magnetic Resonance, Pt C* **1994**, *239*, 79–105
- [121] M. J. J. Blommers, W. Stark, C. E. Jones, D. Head, C. E. Owen, W. Jahnke, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1949–1953
- [122] T. Carlomagno, I. C. Felli, M. Czech, R. Fischer, M. Sprinzl, C. Griesinger, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1945–1948
- [123] S. Bartoschek, G. Buurman, B. H. Geierstanger, J. Lapham, C. Griesinger, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13308–13309
- [124] T. Carlomagno, V. M. Sanchez, M. J. J. Blommers, C. Griesinger, *Angewandte Chemie-International Edition* **2003**, *42*, 2515–2517

- [125] M. Mayer, B. Meyer, *Angewandte Chemie-International Edition* **1999**, *38*, 1784–1788
- [126] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science* **1990**, *249*, 386–390
- [127] S. E. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1990**, *87*, 6378–6382
- [128] C. Königs, M. J. Rowley, P. Thompson, M. A. Myers, M. Scealy, J. M. Davies, L. J. Wu, U. Dietrich, C. R. Mackay, I. R. Mackay, *European Journal of Immunology* **2000**, *30*, 1162–1171
- [129] K. H. O'Connor, C. Königs, M. J. Rowley, J. A. Irving, L. C. Wijeyewickrema, A. Pustowka, U. Dietrich, I. R. Mackay, *Journal of Immunological Methods* **2005**, *299*, 21–35
- [130] C. Königs, A. Pustowka, V. Wegner, X. Dervillez, A. Hüther, V. Klaukien, M. Rowley, I. Mackay, W. Kreuz, C. Griesinger, U. Dietrich, *Peptide mimotopes selected with HIV-1 neutralizing monoclonal antibodies against CCR5 represent motifs crucial for HIV-1 entry*, submitted
- [131] NovaBiochem, *Peptide Synthesis Protocols*, **2006**
- [132] J. P. Tam, C. R. Wu, W. Liu, J. W. Zhang, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 6657–6662
- [133] N. Fujii, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Bessho, H. Yajima, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1987**, 163–164, g1677 Times Cited:45 Cited References Count:23
- [134] W. A. Obrien, Y. Koyanagi, A. Namazie, J. Q. Zhao, A. Diagne, K. Idler, J. A. Zack, I. S. Y. Chen, *Nature* **1990**, *348*, 69–73
- [135] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680
- [136] M. K. Gorny, A. J. Conley, S. Karwowska, A. Buchbinder, J. Y. Xu, E. A. Emini, S. Koenig, S. Zollapazner, *Journal of Virology* **1992**, *66*, 7538–7542

- [137] C. Giragossian, M. Pellegrini, D. F. Mierke, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **2002**, *80*, 383–387
- [138] C. Giragossian, S. Stone, A. M. Papini, L. Moroder, D. F. Mierke, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *293*, 1053–1059
- [139] S. De Luca, G. Morelli, *Journal of Peptide Science* **2004**, *10*, 265–273
- [140] S. Bouguet-Bonnet, P. Mutzenhardt, D. Canet, *Journal of Biomolecular NMR* **2004**, *30*, 133–142
- [141] A. K. Rizos, I. Tsikalas, D. Morikis, P. Galanakis, G. A. Spyroulias, E. Krambovitis, *Journal of Non-Crystalline Solids* **2006**, *352*, 4451–4458
- [142] I. Marseigne, B. P. Roques, *Journal of Organic Chemistry* **1988**, *53*, 3621–3624
- [143] I. Marseigne, P. Roy, A. Dor, C. Durieux, D. Pelaprat, M. Reibaud, J. C. Blanchard, B. P. Roques, *Journal of Medicinal Chemistry* **1989**, *32*, 445–449
- [144] R. Gonzalezmuniz, F. Cornille, F. Bergeron, D. Ficheux, J. Pothier, C. Durieux, B. P. Roques, *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, *37*, 331–340
- [145] M. T. M. Miranda, R. A. Liddle, J. E. Rivier, *Journal of Medicinal Chemistry* **1993**, *36*, 1681–1688
- [146] R. J. Linderman, M. Jaber, B. D. Griedel, *Journal of Organic Chemistry* **1994**, *59*, 6499–6500
- [147] J. Schoepfer, H. Fretz, B. Gay, P. Furet, C. Garcia-Echeverria, N. End, G. Caravatti, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 221–226
- [148] M. J. O'Donnell, *Aldrichimica Acta* **2001**, *34*, 3–15
- [149] C. Garbayjaureguiberry, I. Mccorttranchepain, B. Barbe, D. Ficheux, B. P. Roques, *Tetrahedron-Asymmetry* **1992**, *3*, 637–650
- [150] B. Lygo, J. Crosby, J. A. Peterson, *Tetrahedron Letters* **1999**, *40*, 1385–1388

- [151] J. G. Adamson, M. A. Blaskovich, H. Groenevelt, G. A. Lajoie, *Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 3447–3449
- [152] J. D. Wang, Y. Okada, W. Li, T. Yokoi, J. T. Zhu, *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1997**, 621–624
- [153] A. Trzeciak, W. Bannwarth, *Synthesis-Stuttgart* **1996**, 1433–
- [154] R. W. Jackson, *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 5163–5165
- [155] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *Journal of Biomolecular Nmr* **1995**, *5*, 67–81
- [156] T. Kühnemund, *Synthese von Peptiden aus dem N-terminalen Bereich des humanen CCR5 unter Verwendung von Sulfotyrosinen und deren Bindung an das HIV-1 Glycoprotein gp120*, Ph.D. thesis, Universität Hamburg, **2005**
- [157] A. J. Conley, J. A. Kessler, L. J. Boots, J. S. Tung, B. A. Arnold, P. M. Keller, A. R. Shaw, E. A. Emini, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91*, 3348–3352
- [158] P. V. Rao, S. Bhaduri, J. F. Jiang, R. H. Holm, *Inorganic Chemistry* **2004**, *43*, 5833–5849
- [159] T. Dorfman, M. J. Moore, A. C. Guth, H. Choe, M. Farzan, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 28529–28535
- [160] N. Yahi, J. M. Sabatier, S. Baghdiguian, F. Gonzalezscarano, J. Fantini, *Journal of Virology* **1995**, *69*, 320–325
- [161] X. Dervillez, A. Hüther, J. Schuhmacher, C. Griesinger, J. Cohen, D. Laer, U. Dietrich, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 330–339
- [162] S. C. Gill, P. H. Vonhippel, *Analytical Biochemistry* **1989**, *182*, 319–326
- [163] M. N. Mathieu, J. D. Wade, B. Catimel, C. P. Bond, E. C. Nice, R. J. Summers, L. Otvos, G. W. Tregear, *Journal of Peptide Research* **2001**, *57*, 374–382
- [164] T. L. Hwang, A. J. Shaka, *Journal of Magnetic Resonance Series A* **1995**, *112*, 275–279

- [165] A. Bax, D. G. Davis, *Journal of Magnetic Resonance* **1985**, *65*, 355–360

Anhang A

Zuordnung von CCR5 1-22

Im folgenden werden die aufgenommenen NMR Experimente (Tab.A.1) und die Zuordnung der chemischen Verschiebungen für das CCR5 1-22 Peptid (Tab.A.2) zusammengefasst. Alle Spektren wurden mit *excitation sculpting* [164] als Wasserunterdrückung gemessen.

NMR Experiment	Spektrometer	Pulseprogramm
DQF Cosy	600 Mhz	Bruker: cosydfesgpph
NOESY	600 Mhz	Bruker: NOESYesgpph, 130ms
NOESY	600 Mhz	Bruker: NOESYesgpph, 300ms
TOCSY [165]	600 Mhz	tocsyvolk-2.txt (modifiziertes Brukerprogram mlevessgpph), ¹⁵ N entkoppelt

Tabelle A.1: Zuordnung CCR5

Probe 1mM Peptid 7% D₂O, 0.1M Phosphat Puffer pH6, 0,05M NaCl

	Rest	HN	HA
1	Met		3.960
2	Asp	8.182	4.578
3	Phe(CH ₂ SO ₃)	8.268	4.511
4	Gln	8.341	4.254
5	Val	8.109	4.064
6	Ser	8.340	4.409
7	Ser	8.255	4.682
8	Pro		4.316
9	Ile	7.959	3.945
10	Phe(CH ₂ SO ₃)	7.990	4.580
11	Asp	8.178	4.557
12	Ile	8.040	4.001
13	Asn	8.341	4.550
14	Phe(CH ₂ SO ₃)	7.950	4.384
15	Tyr	7.943	4.480
16	Thr	7.850	4.262
17	Ser	8.105	4.349
18	Glu	8.246	4.520
19	Pro		4.316
20	Ser	8.335	4.294
21	Gln	8.288	4.272
22	Lys	8.183	4.169

Tabelle A.2: Chemische Verschiebung HN und HA für CCR5: Die fettgedruckten Aminosäuren sind ¹⁵N markiert

Anhang B

Probenverzeichnis tr-CCR Messungen

- **XD3 Messungen**

XD3

1 μM XD3, 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 10% D₂O

Aquisitionparameter: T = 300 K, $t_2 = 2\text{K}$, SW = 10.017, $t_1 = 1$, NS = 16k (Cross), 64 (Referenz), DS = 2, Relaxationsdelay D1 = 2s, $4\tau = 60\text{ ms}$

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobe

Pulsprogram: Referenz vkhsqccr.txt, Cross vkhsqccr cross

XD3/gp120

100 μM XD3, 1 μM gp120, 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 10% D₂O

Aquisitionparameter: T = 300 K, $t_2 = 2\text{K}$, SW = 10.017, $t_1 = 1$, NS = 2k (Cross), 32 (Referenz), DS = 2, Relaxationsdelay D1 = 2s, $4\tau = 60\text{ ms}$

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobe

Pulsprogram: Referenz vkhsqccr.txt, Cross vkhsqccr cross

XD3/gp120/sCD4

100 μM XD3, 1 μM gp120, 1 μM sCD4 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 10% D_2O
 Aquisitionparameter: $T = 300\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 10.017$, $t_1 = 1$, $\text{NS} = 8\text{k}$
 (Cross), 32 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$
 Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryo-
 oprobenkopf
 Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr cross

- **CCR5 2-18**

CCR5 2-18

100 μM CCR5 2-18, 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 10% D_2O
 Aquisitionparameter: $T = 300\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 13.95$, $t_1 = 1$, $\text{NS} = 1197$
 (Cross), 128 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$
 Spektrometer: 800 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI
 Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr cross

CCR5 2-18/gp120

100 μM CCR5 2-18, 1 μM gp120, 1 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 10% D_2O
 Aquisitionparameter: $T = 300\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 13.95$, $t_1 = 1$, $\text{NS} = 1197$
 (Cross), 128 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$
 Spektrometer: 800 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI
 Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr cross

CCR5 2-18/gp120/sCD4

100 μM CCR5 2-18, 1 μM gp120, 1 μM sCD4 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 10%
 D_2O
 Aquisitionparameter: $T = 300\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 13.95$, $t_1 = 1$, $\text{NS} = 4\text{k}$
 (Cross), 176 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$
 Spektrometer: 800 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI
 Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr cross

- **CCR5-Nt Verhältnis Peptid/Protein 10/1, pH = 7.3**

CCR5-Nt

111 μM CCR5-Nt, 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 7% D_2O

Aquisitionparameter: $T = 298\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 10.017$, $t_1 = 32$, $\text{sw} = 10.281$, $\text{NS} = 256$ (Cross), 16 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobe

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

CCR5-Nt/gp120

111 μM CCR5-Nt, 11 μM gp120, 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 7% D_2O

Aquisitionparameter: $T = 298\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 10.017$, $t_1 = 32$, $\text{sw} = 10.281$, $\text{NS} = 512$ (Cross), 32 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobe

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

CCR5 2-18/gp120/sCD4

111 μM CCR5-Nt, 11 μM gp120, 11 μM sCD4 250 μL PBS-Puffer pH 7.3, 7% D_2O

Aquisitionparameter: $T = 298\text{ K}$, $t_2 = 2\text{K}$, $\text{SW} = 10.017$, $t_1 = 32$, $\text{sw} = 10.281$, $\text{NS} = 560$ (Cross), 128 (Referenz), $\text{DS} = 2$, Relaxationsdelay $\text{D1} = 2\text{s}$, $4\tau = 60\text{ ms}$

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobe

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

- **CCR5-Nt Verhältnis Peptid/Protein 30/1, pH = 7.0**

CCR5-Nt

120 μ M CCR5-Nt, 250 μ L PBS-Puffer pH 7.0, 7% D₂O

Aquisitionparameter: T = 298 K, t_2 = 2K, SW = 10.017, t_1 = 32, sw = 41.122, NS = 256 (Cross), 16 (Referenz), DS = 16, Relaxationsdelay D1 = 2s, 4τ = 60 ms

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobekopf

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

CCR5-Nt/gp120

120 μ M CCR5-Nt, 4 μ M gp120, 250 μ L PBS-Puffer pH 7.0, 7% D₂O

Aquisitionparameter: T = 298 K, t_2 = 2K, SW = 10.017, t_1 = 32, sw = 10.281, NS = 288 (Cross), 32 (Referenz), DS = 2, Relaxationsdelay D1 = 2s, 4τ = 60 ms

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobekopf

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

CCR5-Nt/sCD4

120 μ M CCR5-Nt, 4 μ M sCD4, 250 μ L PBS-Puffer pH 7.0, 7% D₂O

Aquisitionparameter: T = 298 K, t_2 = 2K, SW = 10.017, t_1 = 32, sw = 10.281, NS = 512 (Cross), 32 (Referenz), DS = 2, Relaxationsdelay D1 = 2s, 4τ = 60 ms

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobekopf

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

CCR5-Nt/gp120/sCD4

120 μ M CCR5-Nt, 4 μ M gp120, 4 μ M sCD4 250 μ L PBS-Puffer pH 7.0, 7% D₂O

Aquisitionsparameter: $T = 298$ K, $t_2 = 2$ K, $SW = 10.017$, $t_1 = 32$, $sw = 10.281$, $NS = 512$ (Cross), 128 (Referenz), $DS = 2$, Relaxationsdelay $D1 = 2$ s, $4\tau = 60$ ms

Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance Spektrometer, 5mm TXI Z-GRD Cryoprobe

Pulsprogram: Referenz vkhsqcccr.txt, Cross vkhsqcccr-cross

Anhang C

Pulsprogramme

Im folgenden sind die modifizierten Pulsprogramme aufgelistet, welche für die Messung der CCR-Raten verwendet wurden.

```
# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt"
;inv4f3gpqh19
;avance-version (00/04/28)
;HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;using f3 - channel
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)
```

```
# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Avance.incl" 1
;Avance2.incl
; for 1
;
```

```
;avance-version (03/02/17)
```

```
;$Id: Avance2.incl,v 1.7.2.3 2003/02/25 14:48:48 ber Exp $
```

```
# 15 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt" 2
```

```
# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Grad.incl" 1
```

```
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
```

```
; for 1
```

```
;avance-version (02/05/31)
```

```
;$Id: Delay.incl,v 1.11 2002/06/12 09:04:22 ber Exp $
```

```
# 17 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt" 2
```

```
"p2=p1*2"
```

```
"p22=p21*2"
```

```
"d0=3u"
```

```
"d11=30m"
```

```
"d12=20u"
```

```
"d26=1s/(cnst4*4)"
```

```
"d14=d0*2+p2"
```

```
"d28=15m-d26/2"
```

```
"d29=15m+d26/2"
```

```
"DELTA=d19-p22/2"
```

```

"DELTA1=d26-p16-d16-p27*2.385-d19*5+p22/2"
"DELTA2=d26-p16-d16-p27*2.154-p0*0.231-d19*5+p22/2-8u"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"
"CEN_HN2=(p22-p2)/2"
"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

# 1 "mc_line 45 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr.txt expanding definition part of mc command before ze"
define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.333333*d1"
"MCREST = d1 - d1"
# 45 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt"
1 ze
# 1 "mc_line 45 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr.txt expanding definition of mc command after ze"
# 46 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt"
d11 pl16:f3 pl12:f2
# 1 "mc_line 47 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr.txt expanding start label for mc command"
2 MCWRK * 2 do:f3
LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCREST
# 48 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt"
3 d12 pl1:f1
(p1 ph1)
d26 pl3:f3
(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph6):f3
d26 setnmr3|0 setnmr0|34|32|33

```


(p1 ph2)

50u

p16:gp2

d16

(p21 ph13):f3

d26

(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph6):f3

d26

(p21 ph2):f3

4u

(p21 ph23):f3

d28

p2 ph1

d29

(p22 ph1):f3

d28

p2 ph1

d29

(p21 ph4):f3

50u

p16:gp3

d16

(p21 ph3):f3

d0

(p2 ph5)

d0

(p21 ph1):f3

p1 ph1

DELTA1

p16:gp1

d16 pl1:f1

p27*0.231 ph7

d19*2

p27*0.692 ph7

d19*2

p27*1.462 ph7

DELTA

(p22 ph1):f3

DELTA

p27*1.462 ph8

d19*2

p27*0.692 ph8

d19*2

p0*0.231 ph8

4u

p16:gp1

d16

4u setnmr3^0 setnmr0^34^32^33

DELTA2 pl16:f3

go=2 ph31 cpd3:f3

1 "mc_line 111 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr.txt expanding mc command in line"

MCWRK do:f3 wr #0 if #0 zd ip3 MCWRK ip6

lo to LBLSTS1 times 2

MCWRK id0

lo to LBLF1 times ST1CNT

```
# 112 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr.txt"
```

```
exit
```

```
ph1=0
```

```
ph2=1
```

```
ph3=0
```

```
ph13=0 2
```

```
;ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
```

```
ph4=1 1 1 1 3 3 3 3
```

```
ph5=0 0 2 2
```

```
ph6=0
```

```
ph7=0 0 1 1
```

```
ph8=2 2 3 3
```

```
ph23=0
```

```
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
```

```
;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
```

```
;pl3 : f3 channel - power level for pulse (default)
```

```
;pl16: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
```

```
;pl18: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
```

```
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at pl18
```

```
;                                     use for fine adjustment
```

```
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
```

```
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
```

```
;p16: homospoil/gradient pulse
```

```
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
```

```
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
```

```
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at pl18
```

```
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
```

```
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
```

```

;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;    d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d26 : 1/(4J)YH
;cnst4: = J(YH)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEC
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1
;    30

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100

;$Id: inv4f3gp-ph19,v 1.2 2000/05/08 11:40:05 eng Exp $

```

```

# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt"
;inv4f3gpqh19
;avance-version (00/04/28)
;HMQC
;2D H-1/X correlation via heteronuclear zero and double quantum
; coherence
;phase sensitive
;with decoupling during acquisition
;using f3 - channel
;water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients
;M. Piotto, V. Saudek & V. Sklenar, J. Biomol. NMR 2, 661 - 666 (1992)
;V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik & V. Saudek, J. Magn. Reson.,
; Series A 102, 241 -245 (1993)

# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Avance.incl" 1
;Avance2.incl
; for 1

;avance-version (03/02/17)

;$Id: Avance2.incl,v 1.7.2.3 2003/02/25 14:48:48 ber Exp $
# 15 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt" 2

# 1 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/Grad.incl" 1
;Grad2.incl - include file for Gradient Spectroscopy
; for 1

;avance-version (02/05/31)

```

```
;$Id: Delay.incl,v 1.11 2002/06/12 09:04:22 ber Exp $
# 17 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt" 2
```

"p2=p1*2"

"p22=p21*2"

"d0=3u"

"d11=30m"

"d12=20u"

"d26=1s/(cnst4*4)"

"d14=d0*2+p2"

"d28=15m-d26/2"

"d29=15m+d26/2"

"DELTA=d19-p22/2"

"DELTA1=d26-p16-d16-p27*2.385-d19*5+p22/2"

"DELTA2=d26-p16-d16-p27*2.154-p0*0.231-d19*5+p22/2-8u"

"CEN_HN1=(p21-p1)/2"

"CEN_HN2=(p22-p2)/2"

"CEN_HC2=(p14-p2)/2"

```

# 1 "mc_line 45 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/"

"vkhsqcccr-crossnew.txt expanding definition part of mc
command before ze"

define delay MCWRK
define delay MCREST
define loopcounter ST1CNT
"ST1CNT = td1 / (2)"
"MCWRK = 0.333333*d1"
"MCREST = d1 - d1"

# 45 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt"

1 ze

# 1 "mc_line 45 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt expanding definition of mc command after ze"

# 46 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/vkhsqcccr-crossnew.txt"
d11 pl16:f3 pl12:f2

# 1 "mc_line 47 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt expanding start label for mc command"

2 MCWRK * 2 do:f3

LBLSTS1, MCWRK
LBLF1, MCREST

# 48 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt"

3 d12 pl1:f1
(p1 ph1)
d26 pl3:f3
(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph6):f3
d26 setnmr3|0 setnmr0|34|32|33
(p1 ph2)
50u
p16:gp2

```

d16

(p21 ph13):f3

d26

(CEN_HN2 p2 ph2) (p22 ph6):f3

d26

(p21 ph2):f3

4u

(p21 ph23):f3

d28

; p2 ph1

d29

(p22 ph1):f3

d28

; p2 ph1

d29

(p21 ph4):f3

50u

p16:gp3

d16

(p21 ph3):f3

d0

(p2 ph5)

d0

(p21 ph1):f3


```

p1 ph1
DELTA1
p16:gp1
d16 pl1:f1
p27*0.231 ph7
d19*2
p27*0.692 ph7
d19*2
p27*1.462 ph7
DELTA
(p22 ph1):f3
DELTA
p27*1.462 ph8
d19*2
p27*0.692 ph8
d19*2
p0*0.231 ph8
4u
p16:gp1
d16
4u setnmr3^0 setnmr0^34^32^33
DELTA2 pl16:f3
go=2 ph31 cpd3:f3
# 1 "mc_line 111 file C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt expanding mc command in line"
MCWRK do:f3 wr #0 if #0 zd ip3 MCWRK ip6
lo to LBLSTS1 times 2
MCWRK id0
lo to LBLF1 times ST1CNT
# 112 "C:/Bruker/XWIN-NMR/exp/stan/nmr/lists/pp/
vkhsqcccr-crossnew.txt"
exit

```

```

ph1=0
ph2=1
ph3=0
ph13=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
;ph4=1 1 1 1 3 3 3 3
ph5=0 0 2 2
ph6=0
ph7=0 0 1 1
ph8=2 2 3 3
ph23=0
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2

```

```

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p116: f3 channel - power level for CPD/BB decoupling
;p118: f1 channel - power level for 3-9-19-pulse (watergate)
;p0 : f1 channel - 90 degree pulse at p118
;
;          use for fine adjustment
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p27: f1 channel - 90 degree pulse at p118
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]

```

```
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d19: delay for binomial water suppression
;      d19 = (1/(2*d)), d = distance of next null (in Hz)
;d26 : 1/(4J)YH
;cnst4: = J(YH)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEC
;cpd3: decoupling according to sequence defined by cpdprg3
;pcpd3: f3 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1
;      30

;for z-only gradients:
;gpz1: 30%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100

;$Id: inv4f3gp-ph19,v 1.2 2000/05/08 11:40:05 eng Exp $
```

Anhang D

Puffer

Volumen	Reagenz
250 μ l	30% Acrylamidlösung (v/v)
313 μ l	2M TRIS-HCl, pH 8.8
25 μ l	10% (w/v) SDS
25 μ l	10% (w/v) APS
2 μ l	TEMED
1.88 ml	H ₂ O

Tabelle D.1: Puffer für 3% Ladegel in der SDS-PAGE

Volumen	Reagenz
2 ml	30% Acrylamidlösung (v/v)
1.88 ml	2M TRIS-HCl, pH 8.8
50 μ l	10% (w/v) SDS
50 μ l	10% (w/v) APS
2.5 μ l	TEMED
1 ml	H ₂ O

Tabelle D.2: Puffer für 12% Trenngel in der SDS-PAGE

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Volker Klaukien
Geburtstag	26.05.1975
Geburtsort	Northeim
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

1988-1994	Werner-von-Siemens-Gymnasium in Bad Harzburg
-----------	--

Wehrdienst

1994-1995	Wehrdienst in Munster
-----------	-----------------------

Studium

1995	Begin eines Chemiestudiums an der TU Braunschweig
1997	Vordiplom Chemie
2001	Diplomprüfung Chemie
04/2001-01/2002	Externe Diplomarbeit an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) Thema: Synthetische Beiträge zur Entwicklung eines neuen, pH neutral abspaltbaren Linkers für die kombinatorische Festphasensynthese
04/2002-05/2007	Doktorand in der Abteilung NMR-basierte Strukturbio- logie von Prof. Dr. Christian Griesinger am Max-Planck- Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen

Publikationen

A. Karacar, V. Klaukien, M. Freytag, H. Thonnessen, J. Omelanczuk, P. G. Jones, R. Bartsch, R. Schmutzler: "Phosphonium salts of 1,8-bis(diphenylphosphino)-naphthalene: Molecular structures and NMR-spectroscopic studies", 2001, Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie, 627 (12), 2589-2603